



HAL
open science

Etude du gène CADPS dans la vulnérabilité aux formes à début précoce de troubles bipolaires

Jeremy Sitbon

► To cite this version:

Jeremy Sitbon. Etude du gène CADPS dans la vulnérabilité aux formes à début précoce de troubles bipolaires. Médecine humaine et pathologie. Université Paris-Est, 2016. Français. NNT : 2016PESC0093 . tel-01559643

HAL Id: tel-01559643

<https://theses.hal.science/tel-01559643>

Submitted on 10 Jul 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**UNIVERSITE PARIS-EST
ECOLE DOCTORALE SCIENCES de la VIE et de la SANTE**

**Thèse de Biologie Moléculaire et Cellulaire
Option Neurosciences**

Présentée par
Jeremy SITBON

Pour obtenir le grade de docteur de l'Université Paris-Est

Etude du gène *CADPS* dans la vulnérabilité aux formes à début précoce de troubles bipolaires

Thèse dirigée par Madame le **Professeur Marion LEBOYER**
et co-dirigée par Monsieur le **Docteur Stephane JAMAIN**

Soutenue le 16 Décembre 2016 devant le jury composé de :

Pr. Frank BELLIVIER

Président du jury

Pr. Thomas BOURGERON

Rapporteur

Dr. Oussama EL FAR

Rapporteur

*La science ne souscrit à une loi ou une théorie qu'à l'essai, ce qui signifie que toutes les lois
et les théories sont des conjectures ou des hypothèses provisoires.*

Karl Popper

Le rivage est plus sûr, mais j'aime me battre avec les flots.
Emily Dickinson

La grande leçon de la vie c'est que parfois, ce sont les fous qui ont raison.
Winston Churchill

*C'est à peine si l'on peut dire que nous sommes, puisque nous ne cessons de changer, de
n'être plus, de n'être pas encore.*
Michel de Montaigne

Ne méprisez la sensibilité de personne. La sensibilité de chacun, c'est son génie.
Charles Baudelaire

Remerciements

Je tiens à remercier le Dr. Oussama El Far et le Pr. Thomas Bourgeron d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail, en dépit de leurs emplois du temps extrêmement chargés.

J'adresse tous mes remerciements au Pr. Frank Bellivier d'avoir accepté de présider ce jury de thèse pour évaluer ce travail, dans le but de l'obtention du grade de Docteur.

Je tiens tout particulièrement à remercier le Dr. Stéphane Jamain pour m'avoir transmis toutes ces connaissances et tout appris sur le monde de la recherche scientifique. Je te dois à peu près tout dans le déroulement de cette thèse, même si je n'ai pas toujours su te le montrer au quotidien.

Tout d'abord, merci de ton investissement et de ta proximité qui m'ont fortement rassuré. J'espère tout de même avoir gagné en autonomie et en confiance, en dépit de mon caractère.

Merci pour ta pédagogie qui m'a permis de réaliser au fil des années que le savoir passe par l'expérimentation, que celui-ci n'est vrai jusqu'à ce que le contraire soit démontré et que la science n'est pas qu'un métier, mais un état d'esprit.

Merci pour ta rigueur et ton exigence. J'ai conscience que je ne suis pas le roi de la paillasse et de l'organisation, mais grâce à toi, je pense avoir évolué.

Et enfin merci pour ces discussions scientifiques ou non. Ton bureau était toujours ouvert et la conversation facile. C'est celles-ci qui m'ont permis de réfléchir sur mon sujet pour le faire grandir et sur d'autres pour évoluer personnellement.

Je remercie le Pr. Marion Leboyer de m'avoir accueilli dans son prestigieux laboratoire. J'espère que nous continuerons à travailler ensemble pour tenter de mieux comprendre les fondements génétiques des affections psychiatriques. Par la même occasion, je suis très reconnaissant envers l'ensemble des psychiatres de l'équipe qui permettent le recrutement de ces familles, et plus particulièrement aux Dr. Emmanuel le Guen et au Dr. Samuel Sarrazin qui m'ont permis de faire le pont entre la clinique et la recherche fondamentale.

Je souhaite également remercier toutes les personnes et les familles qui participent aux études génétiques au sein de la fondation Fondamental. Leur contribution est considérable et notre travail ne pourrait pas progresser sans leur participation. J'espère que nos résultats seront à la hauteur de leurs espoirs.

Je remercie les Dr. Thierry Galli et Dr. Nicolas Pietrancosta qui m'ont permis de discuter de mes résultats au cours de ma thèse et m'aiguiller sur les approches scientifiques à mener pour mettre au point les différentes techniques que j'ai expérimentées durant ma thèse.

Je remercie particulièrement les Dr. Caroline Kappeler et Dr. Marika Nosten-Bertrand qui ont fortement contribué aux résultats de ce travail dans l'expérimentation ainsi que dans la rédaction du manuscrit d'article.

Sans oublier que ce travail n'aurait évidemment pas pu être aussi complet sans l'aide de nombreux collaborateurs, dont Denis Nestvogel l'étudiant de Jeong Seop Rhee au Max Plank Institute, qui ont travaillé sur la caractérisation électrophysiologique des mutations. Mais aussi du Dr Thomas Martin qui travaille actuellement sur la caractérisation des mutations dans un modèle cellulaire spécifique. Enfin à l'équipe du

Dr. Sallah El Mestikawy dont le Dr. Diana Sake et Nina Mansouri, qui m'ont accueilli dans leur laboratoire pour apprendre de nouvelles techniques sur des modèles animaux.

Merci aux nombreuses personnes scientifiques ou non qui ont accepté de relire ce manuscrit. Vos remarques tant au niveau scientifique que syntaxique m'ont énormément aidé et permis d'enrichir ce manuscrit, particulièrement à Elisa Courtois, Nina Mansouri, Réjane Troudet, Laura Gouder, Annabelle Henrion, Aline, Johanna, Lucia, Eden, Elie.

Je tiens à remercier l'ensemble des membres du laboratoire : Annabelle Henrion, Réjane Troudet, Elisa Courtois qui m'ont permis de vivre cette fin de thèse dans des conditions plus sereines. Vous m'avez fait grandir au niveau personnel, les débuts n'étaient pas faciles (je le sais), mais j'ai appris à m'ouvrir au fil du temps grâce à vous pour comprendre que l'on pouvait discuter, rire, échanger, se confier au travail. Je pense pouvoir dire que vous m'avez fait murir. Maintenant je sais que l'on peut venir au travail et aussi créer des liens amicaux pour que la journée soit plus agréable. Vous, qui pensiez que je serais plus heureux si il y avait des hommes dans ce labo, je peux vous dire que vous vous trompiez !

Annabelle, je commence par toi car tu m'as connu depuis le début jusqu'à maintenant encore, j'espère que tu apprécies l'évolution ! Je suis extrêmement reconnaissant envers ta gentillesse, ta bienveillance et ton aide quotidienne et sans réserve que tu m'as apporté. Je sais que j'ai pu être difficile au début, tant dans l'organisation du laboratoire que dans l'aspect technique à la paillasse, mais j'espère avoir un peu acquis de ton expérience.

Sourour (Dr. Mansour ça fait trop guindé), tu as été d'une générosité sans précédent avec moi, à l'image d'une petite maman. Tu as été à l'écoute, malgré le fait que j'offrais peu de ma personne. Je pense que j'arrive plus à m'ouvrir maintenant.

Réjane, merci tout d'abord de m'avoir fortement aidé pour les manips que tu as accepté de réaliser en dépit de ton emploi du temps et sans lien avec ton sujet de thèse. Et aussi merci pour ta capacité à dialoguer, converser sans équivalent. J'ai passé quelques après-midis moins studieuses mais plus enrichissantes socialement.

Elisa, je te remercie d'être venue dans ce labo. En si peu de temps, je crois que j'ai plus communiqué que les trois dernières années ! Je n'avais pas conscience que l'on pouvait avoir une amie au travail pour rire ou discuter. Tu m'as fait vivre une fin de thèse dans les meilleures conditions et a été présente pour me conseiller et m'écouter à tout moment.

Je souhaiterais également remercier tous les gens de l'Institut Mondor pour la Recherche Biomédicale qui m'ont aidé pour l'obtention des résultats que je présente dans ce manuscrit. Je pense en particulier aux plates-formes de génomique, de cytométrie en flux et de microscopie. Mais aussi aux membres des équipes voisines dont particulièrement Michele Boniotto qui a subi mes états d'âmes, mes angoisses et mes déceptions, je te dois beaucoup ! Merci à toi d'avoir été présent pour me soutenir durant tous ces déjeuners pour me faire sortir de la science et débattre sur la supériorité de la Juve sur le Paris Saint Germain (bon pour en finir, je te le dis honnêtement, je n'ai jamais pensé que le PSG était un plus grand club que la juve, ça serait mentir). Enfin merci à toi pour l'aide technique et le temps que tu m'as consacré (je me demande encore pourquoi ?). Tu m'as fait part de ton expérience et de ton savoir pour mettre au point la génération de lignées stables grâce à l'infection lentivirale sans rien demander en retour

(il est encore temps de te mettre en premier auteur !). Je pense que tu mérites ton poste et que tu dois enseigner impérativement!

Enfin, je tiens à remercier ma famille et mes amis qui ont toujours été à mes cotés et qui m'ont soutenu pendant ces nombreuses années. Je pense spécialement à mes parents qui m'ont témoigné une confiance aveugle quant à mes choix d'études et soutenu quel que soit le parcours que je décidais d'emprunter. Je pense également à l'ensemble de mes amis, qui ont fait preuve de beaucoup de patience et d'écoute en dépit du fait qu'ils ne comprenaient pas grand chose à mon travail.

Avec une prévalence de 1% dans la population générale, le trouble bipolaire (TB) est une maladie psychiatrique commune, chronique et sévère. Les études familiales réalisées pour cette affection ont montré une contribution génétique forte dans la prédisposition au TB, plus particulièrement pour les formes à début précoce de la maladie (TBDP). Malgré tout, les mécanismes moléculaires à l'origine de la maladie restent mal connus. Ainsi, suivant une étude de liaison génétique, nous avons pu identifier des variations rares dans un gène codant la protéine activatrice de l'exocytose dépendante du calcium (CADPS for *Calcium-dependant activator protein for secretion*) chez des patients avec un TBDP. CADPS est une protéine essentielle pour la régulation de l'exocytose et du chargement vésiculaire des monoamines dans les cellules neuronales et neuroendocrines. Nous avons étudié l'impact de ces mutations sur la fonction de ce gène, et montré que plusieurs d'entre elles altéraient son expression ainsi que ses fonctions. D'autre part, nous nous sommes intéressés au modèle murin privé d'un allèle de *Caps* (*Caps1^{+/-}*) et montré que celles-ci décrivaient des comportements hyperactifs ainsi qu'une réponse au stress variable comparée aux souris sauvages.

L'ensemble de nos résultats suggèrent pour la première fois que ce gène pourrait jouer un rôle dans les formes à début précoce de trouble bipolaire et ouvrent de nouvelles voies de recherche pour comprendre les mécanismes moléculaires qui sont altérés chez les sujets atteints.

SOMMAIRE

Liste des abréviations.....	10
Liste des figures.....	12
Liste des tableaux	14
CHAPITRE I – INTRODUCTION.....	15
1. Aspects pathologiques dans la santé mentale.....	16
1.1. Cerveau et soi.....	16
1.2. Expérience de la folie.....	19
1.3. La psychiatrie.....	21
1.3.1. <i>Historique.....</i>	<i>21</i>
1.3.2. <i>Classification.....</i>	<i>21</i>
1.4. Les troubles bipolaires.....	24
1.4.1. <i>Historique, définition.....</i>	<i>24</i>
1.4.2. <i>Les signes cliniques.....</i>	<i>26</i>
1.4.3. <i>Le trouble bipolaire est une question de santé publique majeure.....</i>	<i>28</i>
1.4.4. <i>Traitement.....</i>	<i>30</i>
1.4.5. <i>Evolution.....</i>	<i>30</i>
2. Neurobiologie des émotions.....	33
2.1. Cerveau et émotions.....	33
2.1.1. <i>Définition d'une émotion.....</i>	<i>33</i>
2.1.2. <i>Neurobiologie anatomique des émotions.....</i>	<i>33</i>
2.2. Neurobiologie moléculaire des émotions.....	36
2.2.1. <i>Sérotonine.....</i>	<i>36</i>
2.2.2. <i>Noradrénaline.....</i>	<i>38</i>
2.2.3. <i>Hypothèse biogénique des amines.....</i>	<i>39</i>
2.2.4. <i>Lithium.....</i>	<i>40</i>
2.2.5. <i>Stress.....</i>	<i>41</i>
3. Génétique du trouble bipolaire.....	44
3.1. Epidémiologie des troubles bipolaires.....	44
3.1.1. <i>Etudes de jumeaux.....</i>	<i>44</i>
3.1.2. <i>Etudes d'adoption.....</i>	<i>45</i>
3.2. Etude d'association génétique dans les troubles bipolaires.....	47
3.2.1. <i>Analyse de gènes candidats.....</i>	<i>47</i>
3.2.2. <i>Etude d'association sur l'ensemble du génome.....</i>	<i>51</i>
3.3. Analyse de liaison sur génome entier.....	55

4. Le gène Calcium-dependant activator protein for secretion candidat.....	59
4.1. Exocytose de neurotransmetteurs.....	59
4.2. Calcium activator protein for secretion.....	65
4.2.1. <i>Clonage de CADPS humain.....</i>	<i>66</i>
4.2.2. <i>CADPS est une protéine essentielle à l'amorçage de l'exocytose.....</i>	<i>66</i>
4.2.3. <i>La fonction de CADPS n'est pas redondante avec la protéine Munc13.....</i>	<i>69</i>
4.2.4. <i>Hypothèse mécanistique.....</i>	<i>70</i>
4.2.5. <i>CADPS intervient dans le chargement vésiculaire des monoamines.....</i>	<i>71</i>
4.2.6. <i>CADPS permet la transition du complexe SNARE.....</i>	<i>71</i>
4.2.7. <i>CADPS est impliqué dans les comorbidités associées aux troubles bipolaires.....</i>	<i>73</i>
4.2.8. <i>La deuxième isoforme de CADPS est associée à des maladies psychiatriques.....</i>	<i>74</i>
CHAPITRE II – RESULTATS.....	77
1. Des mutations dans le gène CADPS identifiées chez des patients avec des troubles bipolaires à début précoce affectent la fonction de la protéine.....	78
ARTICLE 1.....	81
Discussion partielle sur les conséquences fonctionnelles des mutations dans le gène CADPS identifiées chez des patients avec des formes à début précoce de troubles bipolaires.....	115
2. La caractérisation de la souris <i>Caps1^{+/-}</i> peut nous aiguiller sur la physiopathologie du trouble bipolaire.....	122
ARTICLE 2.....	125
Discussion partielle sur la caractérisation de la souris <i>Caps1^{+/-}</i>	160
CHAPITRE III – DISCUSSION.....	163
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	183
ANNEXES.....	207
Annexes I – Critères diagnostiques du DSM-V.....	208
Annexes II – Lexique.....	217
Annexes III –Figure d'article de revue.....	218

Liste des abréviations

5'/3'-UTR	<i>5'/3'-untranslated region</i>
5-HT	5-hydroxytryptophane
ADHD	<i>Attention Deficit and Hyperactivity Disorder</i>
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AMPA	<i>α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxasole propionic acid</i>
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
AZ	<i>active zone</i>
BD	<i>bipolar disorder</i>
bp	<i>base paire</i>
Ca ²⁺	calcium
CA3	<i>cornu ammonis 3</i>
CADPS, CAPS, CADPS1	<i>calcium-dependant secretion activator 1, calcium dependant activator protein for secretion 1</i>
CADPS2, CAPS2	<i>calcium-dependant secretion activator 2, calcium dependant activator protein for secretion 2</i>
CIM-10	classification internationale des maladies
cM	centi-Morgan
DA	dopamine
DCBD	<i>Dense-core vesicle Binding Domain</i>
DG	<i>dentate gyrus</i>
DID	<i>Dynein Interacting Domain</i>
DL	déséquilibre de liaison
DSM-V	<i>diagnostic and statistical manual, fifth edition</i>
EEG	électroencéphalogramme
EOBD	<i>early-onset bipolar disorder</i>
EPSC	<i>excitatory post synaptic current</i>
EST	<i>expressed sequence tag</i>
et al.	<i>et alias</i>
FFN511	<i>false fluorescent neurotransmitter 511</i>
FM1-43	<i>FM styryl fluorescent dye</i>
GABA	acide γ -aminobutyrique
GWAS	<i>Genome-wide association study</i>
HGNC	<i>HUGO Gene Nomenclature Committee</i>
HZ	hétérozygote
IP ₃	Inositol tri-phosphate
IRM	imagerie par résonance magnétique
kb	kilobase
LOD score	<i>logarithm of the odds</i>

LTP	<i>long-term potentiation</i>
Mb	mégabase
mEPSC	miniEPSC
MHD	<i>Munc homology domain</i>
ms	millisecondes
MZ	monozygote
NE	norépinéphrine, noradrénaline
NMDA	<i>N-methyl D-aspartate</i>
NPL	<i>non paramétrique LOD score</i>
NSF	<i>N-Ethylmaleimide Sensitive Factor</i>
nt	nucléotide
OMS	organisation mondiale de la santé
pb	paire de bases
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PFC	<i>pre-frontal cortex</i>
PH	<i>Pleckstrin homology domain</i>
PTSD	<i>Post traumatic stress disorder</i>
RRP	<i>ready releasable pool</i>
RT-PCR	<i>reverse transcriptase PCR</i>
SCZ	schizophrénie
SERT	<i>serotonin transporter</i>
SNAP	<i>Soluble NSF Attachment Proteins</i>
SNC	système nerveux central
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
TB	trouble bipolaire
TB1	TB de type 1
TB2	TB de type 2
TBDP	trouble bipolaire à début précoce
TDT	<i>transmission disequilibrium test</i>
TTX	tetrodotoxin
ω -CTX	ω -conotoxin

Liste des figures

Figure I. 1. Doctrine phrénologique du début du XIXème siècle (Kandel, Schwartz, and Jessell 2000).....	18
Figure I. 2. Distribution d'une population de patients avec un trouble bipolaire en fonction de l'âge d'apparition des premiers symptômes (Bellivier et al. 2003).....	29
Figure I. 3. L'hypothèse génétique d'un continuum entre la schizophrénie et les troubles de l'humeur (Nick Craddock, O'Donovan, and Owen 2006).....	32
Figure I. 4. Le circuit neuronal d'une émotion de Papez, étendu par Paul MacLean (Kandel, Schwartz, and Jessell 2000).....	35
Figure I. 5. Le système sérotoninergique (Heimer, 1995).....	37
Figure I. 6. Le système noradrénergique (Heimer, 1995).....	38
Figure I. 7. Action des antidépresseurs sur les systèmes sérotoninergique et noradrénergique (Kandel, Schwartz, and Jessell 2000).....	40
Figure I. 8. Mode d'action du lithium (Kandel, Schwartz, and Jessell 2000).....	41
Figure I. 9. Epidémiologie de la variance calculée pour la part génétique et environnementale partagée ou non dans la schizophrénie et les troubles bipolaires. (Lichtenstein et al. 2009).....	46
Figure I. 10. Représentation du risque relatif de développer une maladie psychiatrique en fonction de la variation allélique. (Psychiatric GWAS Consortium Steering Committee 2009).....	50
Figure I. 11. Régions du génome qui ont été liées aux troubles bipolaires (Serreti and Mendelli, 2008).....	56
Figure I. 12. Graphique de l'analyse non paramétrique multipoints de liaison entre le chromosome 3 et le TBP. (B. Etain et al. 2006).....	57
Figure I. 13. Position des mutations non-synonymes trouvées dans le gène <i>CADPS</i> chez des patients avec un trouble bipolaire à début précoce.....	58
Figure I. 14. Trafic vésiculaire de neurotransmetteurs dans une terminaison nerveuse. (Jahn and Fasshauer 2012).....	61
Figure I. 15. Le schéma moléculaire de la fusion des vésicules synaptiques (Sudhof T and Rizo J, 2011).....	64

Figure I. 16. Dynamique de la formation du complexe SNARE. (Kasai, Takahashi, and Tokumaru 2012).....	73
Figure II. 1. Résultat de la liaison génétique entre notre SNP associé avec le TBDP (rs35462732) et celui du PGC pour l'ADHD (rs2367089).....	118
Figure II. 2. Tri sur la GFP de cellules PC-12 infectées par un vecteur lentiviral (pF(syn)W-RBN-CADPS-eGFP) contenant les différentes isoformes du gène CADPS.....	121
Figure II. 3. Expression des protéines SNAP25 et VAMP2 sur des cerveaux de souris <i>Caps1</i>^{+/-}	161
Figure III. I. Estimation de la contribution des variations rares d'origine récente et de l'interaction gène-environnement dans l'étiologie des maladies psychiatriques, tout au long d'un spectre de désavantage reproductif. (Uher 2009).....	165
Figure III. 2. Mécanismes de fusion des vésicules synaptiques. (Wightman and Haynes 2004).....	170
Figure III. 3. Les mécanismes de plasticité synaptique sont potentiellement déstabilisants. (Turrigiano,2008).....	176
Figure III. 4. Modèle expliquant le mécanisme d'action de CADPS dans les troubles bipolaires.....	181

Liste des tableaux

Tableau I. 1. Méta-analyse non exhaustive des principaux gènes candidats associés aux troubles bipolaires.....	49
Tableau I. 2. Etude de GWAS et méta-analyse dans les troubles bipolaires.....	54
Tableau II. 1. Liste des différents SNP localisés dans le gène <i>CADPS</i>, associés dans les différentes maladies psychiatriques lors des GWAS réalisés par le PGC.....	118
Tableau II.2. Etude clinique des familles de patients sélectionnés avec les mutations dans le gène <i>CADPS</i>.....	119
Tableau III. 1. Association entre les gènes <i>SNAP25</i>, <i>VAMP1</i>, <i>VAMP2</i>, <i>STX1a</i>, <i>SYT1</i>, <i>SYT2</i> et les cinq maladies psychiatriques majeures. (Cupertino et al. 2016).....	173

INTRODUCTION

1. Aspects pathologiques dans la santé mentale

1.1. Cerveau et soi

Le cerveau humain est un réseau de plus de 100 milliards de cellules nerveuses interconnectées dans un système qui permet la construction de notre perception du monde qui nous entoure, de nos actions, de notre apprentissage et de nos souvenirs.

En somme, nos comportements peuvent être expliqués en partie grâce à la neurobiologie qui tend à comprendre le fonctionnement de notre cerveau, organe unique qui dicte et gouverne l'ensemble de nos actes. Le deuxième aspect singulier du cerveau vient de sa capacité à s'imprégner du monde qui l'entoure pour s'adapter, apprendre et corriger les décisions qui seront entreprises par l'individu. Cet organe plastique, témoin de l'évolution est donc à l'image de notre personnalité, de part les actes qui en résultent mais aussi grâce à l'expérience qui le modèle. En d'autres termes, le cerveau peut se placer dans l'exécution de nos sens en temps qu'*être sensé* (doté de sens) ; mais aussi dans la réception et la perception d'un stimulus en temps qu'*être sensible*.

Ainsi, lorsqu'on s'interroge sur: sommes-nous notre cerveau ? Nous sommes confrontés à la singularité de cet organe, témoin de l'environnement qui l'entoure, et en même temps acteur des décisions qu'il entreprend. Les réponses apportées placent alors cet organe au carrefour de la métaphysique et des sciences, de l'esprit et du corps. Mais ici, nous nous intéresserons seulement à l'aspect scientifique dans l'évocation d'une émotion, qu'on pourrait définir comme le cerveau émotif. En effet, dans cette démarche positive de l'esprit les causes premières ne seront pas recherchées, seuls les phénomènes seront observés pour tenter de les expliquer, comme l'énonçait Auguste Comte dans son *Discours sur l'esprit positif*: « En un mot, la révolution fondamentale qui caractérise la virilité de notre intelligence consiste essentiellement à substituer partout, à l'inaccessible détermination des causes proprement dites, la simple recherche des lois, c'est à-dire des relations constantes qui existent entre les phénomènes observés » (Comte 1844)

Si les comportements considérés comme résultante de nos émotions peuvent être visibles et matérialisables, la pensée qui en émane reste un concept abstrait qui n'a pas de définition certaine. Malgré tout, dans l'imaginaire collectif, celle-ci est véritable et se

créée dans le cerveau. Ainsi, on pourrait aisément penser que comprendre le cerveau permettrait de comprendre la pensée et donc les comportements propres à chacun qui en résultent. Toutefois, à l'image de la signature génétique, la pensée est singulière et guide les comportements, mais elle se construit sur une expérience, sur un raisonnement inductif qui ne peut avoir de cause première. Ainsi, on peut dire que la certitude du processus de pensée est unique car l'essence de « *cette pensée, je pense, donc j'existe, est la première et la plus certaine qui se présente à celui qui conduit ses pensées par ordre* » (Descartes 1651) mais son essence relève d'une démarche empirique.

Prenons l'exemple de la physiologie en médecine où l'objectif est de comprendre le fonctionnement général d'un organe, d'un organisme ancré dans son environnement. Or dans le cas de la neurobiologie de la pensée, celle-ci n'a de sens que si elle est étudiée dans sa singularité, dans son individualité. Est-il dès lors possible d'en formuler une théorie ? D'autre part, nous observons que l'appropriation du corps s'établit grâce à un sens écologique du corps qui a lieu avant même d'avoir conscience de soi (Neisser 1991). Ainsi, cette distinction nous interroge sur la place de l'expérience proprioceptive et de l'expérience psychologique pour la définition du soi. Le but n'est donc pas d'étudier le cerveau pour tenter en vain de comprendre la démarche de pensée mais de comprendre le cerveau sans finalité. C'est à travers cette approche non-essentialiste que les neurosciences ont pour vocation de produire des théories réfutables, et non de répondre à des questions métaphysiques générales pour définir le soi, comme l'énonçait Popper dans *La logique de la découverte scientifique* « Des idées audacieuses, des anticipations injustifiées et des spéculations constituent notre seul moyen d'interpréter la nature, notre seul outil, notre seul instrument pour la saisir [...] Ceux parmi nous qui refusent d'exposer leurs idées au risque de la réfutation ne prennent pas part au jeu scientifique » (Popper 1934). Cette quête a traversé les siècles depuis l'Antiquité et les philosophes grecs, en passant par Descartes, John Locke (Locke 1690) à la renaissance et Charles Darwin (Darwin 1874) au milieu du XIX^{ème} siècle : l'observation des comportements a toujours intrigué. Elle a même donné naissance à l'*éthologie* qui vise à étudier les comportements animaux dans leur environnement et plus tard à la *psychologie expérimentale* qui se sert de conditions environnementales contrôlées pour comprendre les comportements. Mais c'est Franz Joseph Gall, un physicien et neuroanatomiste de la fin du XVIII^{ème} siècle qui proposa que les comportements

émanent du cerveau, que celui-ci peut être subdivisé en régions distinctes qui contrôlent différentes fonctions (Figure I. 1) et qu' enfin ces fonctions se construisent avec l'expérience (Gall, Spurzheim 1810). Cette doctrine phrénologique du cerveau n'est pas si simple ; car d'une part elle exclut la psychologie en affirmant que tous les procédés mentaux ont une origine biologique ; mais fige par la même cet organe en omettant les travaux de Flourens qui montrent que l'ensemble du cortex est *agrégé* dans le but de réaliser une fonction (Flourens 1824) et par la suite de Charles Sherrington (Sherrington 1920) et Simon Cajal qui, d'un point de vue physiologique *connecte* les différentes cellules neuronales comme des unités de signalisation arrangées par groupes fonctionnels (Ramón y Cajal S. [1892] 1977). Par conséquent, le cerveau vu par Wernicke, Broca ou Brodmann sera arrangé en différentes régions mais toujours interconnectées grâce à des voies de signalisation neuronales (Brodmann 1909).

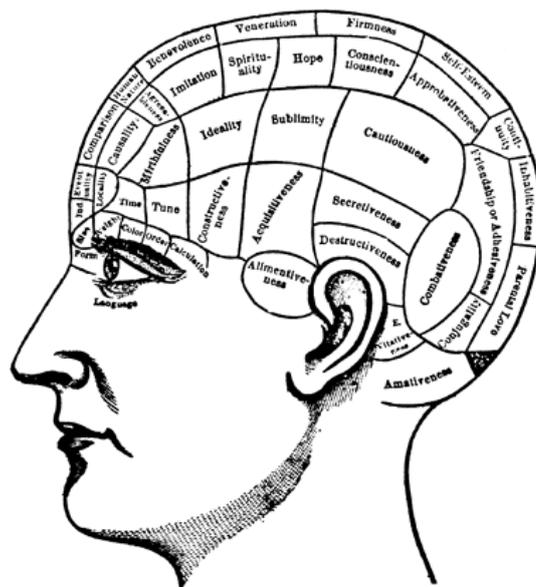


Figure I. 1. Doctrine phrénologique du début du XIXème siècle (Kandel, Schwartz, and Jessell 2000).

Franz Joseph Gall, propose que le cerveau gouverne nos comportements, il est subdivisé en 35 organes. La personnalité de chacun serait caractérisée par les différentes bosses sur le crâne

Cette cartographie du cerveau illustrée pour ses fonctions sensorielles, motrices et cognitives, peut-elle se concevoir pour le cerveau affectif, émotionnel ?

Les études sur des patients atteints de troubles du langage ou d'épilepsie (Annexe II) ont permis de démontrer que des anomalies dans les aires temporeles de l'hémisphère droit

conduisaient à des défauts d'appréciation de la qualité du langage (prosodie), ou que des patients souffrant d'épilepsie chronique temporale décrivaient aussi des *ictal phenomena* relatifs aux sens pendant les périodes de crise, mais aussi *interictal phenomena* en dehors des périodes de crise qui a fait naître un syndrome psychiatrique. Ces patients souffrent hors périodes de crise d'un déclin d'envie sexuelle, d'agressivité sociale, de foi exacerbée. Ainsi, d'un point de vue anatomique on peut dire que la neurobiologie joue un rôle dans l'expression de nos émotions, sans pour autant que les liens directs ou indirects soient de nos jours réellement compris.

Malgré les avancées en neuro-anatomie et l'émergence de la psychiatrie, celles-ci ne permettent pas de saisir la complexité de ce qu'est la personnalité. La vision cartographique et scindée de la science nous informe sur l'aspect particulier de certains traits, mais ne peut se substituer à l'expérience sociale qui influe, choisit naturellement. Les émotions et l'humeur de manière générale, ne sont pas à opposer à la part raisonnable et raisonnée de notre cerveau dans la définition du soi en tant qu'être conscient. Souvent limité à nos capacités réflexives, l'aspect émotif est refoulé dans nos sociétés car il relève de l'instinct, du primaire et renvoie à la forme animale du sujet. Comme si la raison actait en faveur de la régulation de nos émotions, il faudrait dès lors essayer de les contraindre, de les circonscrire, de les normer. La conscience de cet état primaire dans son sens de premier ne serait-il pas alors l'expression sincère de notre être ?

En tout cas, c'est dans la déraison que l'émotion se situe hors de nos sociétés : dans le domaine du pathologique. Ainsi, je pense que la neurobiologie des émotions peut constituer un avantage si elle est considérée dans son aspect pathologique car elle s'affranchit d'une complexité certaine et parce qu'elle ne peut être théorisée, ou généralisée. Dans ces formes les plus poussées, l'expérience émotionnelle peut être vécue de manière erronée par rapport aux réalités objectives, s'inscrivant hors du rationnel dans le domaine de la folie.

1.2. Expérience de la folie

Pour définir une pathologie, il faut s'adresser aux symptômes observables et positifs qui se manifestent chez le patient : « La définition d'une maladie est l'énumération des symptômes qui servent à connaître son genre et son espèce, et à la distinguer de toutes

les autres » (Plater 1609). De nos jours, il demeure difficile de définir un insensé avec des critères objectifs, scientifiques et une symptomatologie positive. Paradoxalement, la folie est ce qui se voit dans les yeux de tous, car elle apparaît évidente, explicite et intuitive « Il n'est pas besoin pour connaître l'hallucination ou le délire dont il est atteint, qu'il fasse de faux syllogismes ; on s'aperçoit aisément de son erreur et de son hallucination par la discordance qu'il y a entre ses actions et la conduite que tiennent les autres hommes » (Sauvages 1772). Elle trouve ainsi sa définition dans ce qui est hors de nous et se conçoit dans l'altérité : « le fou n'est pas manifeste dans son être ; mais s'il est indubitable, c'est qu'il est autre » (Foucault 1979). Ainsi, la folie est évidente de par sa relation extérieure avec l'être raisonnable « Nous appelons folie cette maladie des organes et du cerveau qui empêche un homme nécessairement de penser et d'agir comme les autres » (Voltaire 1819). Malgré tout, ce rapport à la raison est complexe, car elle ne fait pas que *s'opposer à elle* (en tant que déraison) mais existe *par rapport* à elle pour « la représenter et lui donner valeur d'exigence » (Foucault 1979) et *pour elle* car « elle apparaît au regard d'une conscience idéale qui la perçoit comme différence avec les autres » (Foucault 1979).

Le jugement qui en découle se place alors sous l'aspect de la morale pour chacun, et dans une forme d'objectivité médicale sous l'aspect de la rationalité pour la psychiatrie.

Nous nous placerons dès lors dans cette logique en considérant que dans la folie, la vie morale est faussée, la volonté est mauvaise mais pas déraisonnée. Car, dans l'expérience de la folie c'est justement la conscience certaine de ne pas être fou (en tant qu'anosognosie) qui renforce le diagnostic. On pourra seulement dire que la folie influe sur la raison comme un aimant sur un objet en la tenant hors d'elle avec confiance. Ce mouvement irrationnel qui s'inscrit dans une conviction, une croyance, une fidélité illusoire à la raison constituera les bases de la science positive de la folie, comme le dit Sauvages « il est vrai que la suppression de certaines évacuations cause souvent des maladies, mais il ne s'en suit pas qu'on puisse donner le nom de maladie à cette suppression » (Sauvages 1772).

Ainsi, même si l'expérience de la folie est perçue depuis l'antiquité, le déplacement d'un aspect moral à un aspect rationnel qui s'inscrit dans une classification médicale et relevant du pathologique, a été permis par une vision positive de la folie. En somme, la psychiatrie a permis de s'abstenir rationnellement des différences entre le fou et la folie,

dans une forme de transcendance du délire. Dans le cadre des émotions, la psychiatrie cherche à définir les formes pathologiques des troubles affectifs de l'humeur.

1.3. La psychiatrie

1.3.1. Historique

Johann-Christoph Reil en 1808 est le premier à utiliser dans son livre *Rhapsodies* le terme de psychiatrie pour parler de cette nouvelle spécialité médicale. C'est toutefois grâce à Pinel avec l'allégorie de la libération des aliénés de Bicêtre en 1794 que l'image de la folie est requalifiée d'aliénation mentale : « Ce ne fut pas sans regret extrême que je ne pus voir (pendant l'exercice de mes fonctions à titre de Médecin de Bicêtre durant les premières années de la Révolution) le terme heureux de cette coutume barbare et routinière ; mais j'étais d'un autre côté tranquille, et je me reposais sur l'habileté du surveillant de cette hospice (Pussin), qui n'avait pas moins à cœur de faire cesser cet oubli des vrais principes. Il y parvint heureusement deux années après, et jamais aucune mesure ne fut mieux concertée et suivie d'un succès plus marqué. Les aliénés, loin d'être des coupables qu'il faut punir, sont des malades dont l'état pénible mérite tous les égards dus à l'humanité souffrante, et dont on doit rechercher par les moyens les plus simples à rétablir la raison égarée » (Pinel 1809). Ainsi, Pinel puis son disciple Esquirol furent les instigateurs d'un traitement rationnel de l'aliénation mentale, basé sur l'observation et l'écoute du patient, lui rendant sa part d'humanité. C'est en ce sens que l'aliénation mentale sort du mystique et de la morale, en tant qu'objet scientifique « Le véritable traitement psychique s'en tient [...] à cette conception que la folie n'est pas une perte de raison, ni du côté de l'intelligence, ni du côté de la volonté, mais un simple dérangement d'esprit, une contradiction dans la raison qui existe encore » (Hegel 1970). De nos jours, un trouble mental est un trouble altérant la pensée, les sentiments, ou le comportement entraînant ainsi une souffrance et/ou des difficultés d'intégration sociale.

1.3.2. Classification

Naturellement, cette vision discursive de l'aliénation mentale comme maladie, a donné lieu à une approche analytique, classificatrice. Bien qu' Hippocrate propose une première classification des maladies mentales et que Paracelse (Paracelse 1926)

distingue les *Lunatici* (dont la maladie tient son origine à la lune) des *Insani* (qui doivent leur mal à leur hérédité) des *Vesani* (qui sont privés de sens et de raison par abus) des *Melancholici* (qui inclinent à la folie par quelque vice de leur nature interne) ; c'est Pinel qui dans la *Nosographie philosophique* apporte les bases de la classification actuelle. Inspiré par des naturalistes comme Linné ou Jussieu et des anatomistes comme Cuvier, Pinel classe les vésanies. En cela, il admet qu'il n'existe pas de lésions cérébrales spécifiques et que la classification doit se faire au niveau du comportement, en allant du moins au plus perturbé. Il différencie alors la simple mélancolie ou délire partiel, qui est « dirigé sur un seul objet », de la manie ou délire généralisé avec sa forme particulière de « manie furieuse sans délire ». Il distingue aussi la démence généralisée où « il n'y a point de jugement, ni vrai, ni faux : les idées sont comme isolées, et vraiment à la suite des autres ; mais elles sont nullement associées, ou plutôt la faculté de la pensée est abolie » jusqu'à l'idiotisme où il y a une « abolition totale des fonctions de l'entendement » qui deviendra par la suite « la démence aigue » chez Esquirol (Esquirol 1838).

A l'époque de Pinel, l'aliénation mentale est construite autour d'un trouble contenu de la pensée : un délire; faisait souvent référence à la manie. Car il s'agit d'une maladie mentale typique et fréquente, susceptible de guérir et ayant des causes « prédisposantes » ou « occasionnelles ». Il réfute toute idée visant à considérer que ces maladies proviennent directement d'une atteinte cérébrale aigüe, mais qu'elles seraient issues d'atteintes viscérales provoquées par les émotions et les passions, à l'instar de la théorie « indirecte » de James et Lange qui propose que l'émotion comme le fruit d'une atteinte corporelle primaire. (Postel 1998). Il est intéressant de noter que dès le XVIIIème siècle, la dualité causale dans l'affection psychiatrique (héréditaire et environnementale) est déjà observée par Pinel.

Pour résumer cette nosographie du délire à l'époque classique, les articles de l'*Encyclopédie* peuvent nous aiguiller :

-La manie, qui est un délire sans fièvre (à opposer à la frénésie) comporte « toutes ces maladies longues, dans lesquelles les malades non seulement déraisonnent, mais n'aperçoivent pas comme il faut et font des actions qui sont ou paraissent sans motifs, extraordinaires et ridicules ».

-La mélancolie est « un délire particulier, roulant sur un ou deux objets déterminément, sans fièvre ni fureur, en quoi elle diffère de la manie et de la frénésie. Ce délire est joint

le plus souvent à une tristesse insurmontable, à une humeur sombre, à une misanthropie, à un penchant décidé pour la solitude ».

-La démence n'est que « l'exercice dépravé de la mémoire et de l'entendement » qui « paralyse l'esprit » entraînant « une abolition de la faculté de raisonner ».

Aujourd'hui ce trouble contenu de la pensée, caractérisé par la présence d'idées en désaccord avec des faits objectivables s'appuie sur ces premières classifications dans les différentes formes, figures qu'elle manifeste. Or la connaissance et l'expérience de ces différentes formes ont permis de les distinguer selon une sémiologie relevant de son « mode opératoire » (mode, thème, mécanisme, systématisation, adhésion, participation) et non plus selon les figures qu'elles incarnent. De même que ces manifestations observables classificatrices ont fait place à une étiologie rationnelle permettant de les encrer dans des pathologies.

En somme, il convient d'observer à quel point la place et la caractérisation du délire en psychiatrie ont changé. En cela même que le délire ne constitue plus l'unique objet de recherche mais s'intègre la plupart du temps dans une pathologie en tant que symptôme flagrant d'une affection globale. C'est également en ce sens que la psychiatrie n'est plus juge de la morale en la cantonnant au délire (en tant que médecin des fous) mais rationnelle dans son diagnostic en la catégorisant (en tant que médecin des troubles mentaux).

On s'intéressera alors par la suite à un trouble de l'humeur qui a suivi cette évolution nosographique dans la terminologie et à la place qu'il détient dans le champ de la psychiatrie.

1.4. Les troubles bipolaires

1.4.1. Historique, définition

Dès le I^{er} ou II^{ème} siècle après JC, Aretée de Cappadoce décrit des situations où « nous voyons que les mélancoliques, surtout ceux en qui cette disposition est invétérée, deviennent facilement maniaques, et que lorsque la manie cesse, la mélancolie recommence, en sorte qu'il y a passage et retour de l'une à l'autre, selon certaines périodes » (Aretée de Cappadoce, n.d.). Willis au XVII^{ème} ne faisait que reprendre les anciennes descriptions en montrant l'alternance cyclique de l'humeur. Cette humeur qui, par définition est dynamique, constitue notre « disposition affective fondamentale, riche de toutes les instances émotionnelles et instinctives elle donne à chacun de nos états d'âme une tonalité agréable ou désagréable oscillant entre les deux pôles extrêmes du plaisir et de la douleur » (Delay 1961) peut être pathologique, dans les formes morbides qu'elle incarne. En effet, dès 1747 James, dans son *Dictionnaire universel de la médecine* notait déjà qu'il est « absolument nécessaire de réduire la mélancolie et la manie à une seule espèce de maladie car [...] elles ont l'une et l'autre la même origine et la même cause » (R. J. James 1748). Aussi, J.P. Falret avait bien individualisé, en tant que « folie circulaire » caractérisée « par l'évolution successive et régulière de l'état maniaque, de l'état mélancolique et d'un intervalle lucide plus ou moins prolongé » (J.P Falret, 1854), cette affection de l'humeur.

Mais, c'est dans la sixième édition du *Traité de psychiatrie* en 1899, que Kraepelin distingue plusieurs entités morbides endogènes : la démence précoce et paraphrénies (dont le noyau initial est représenté par la catatonie de Kahlbaum), de la psychose maniaco-dépressive. Cette distinction s'opère dans l'évolution du pronostic des deux pathologies, car il suppose que le devenir démentiel dans la psychose maniaco-dépressive est épargné. Ainsi, même si les délires maniaques et mélancoliques étaient déjà bien décrits, tout comme la circularité du trouble, Kraepelin en a nommé et systématisé la pathologie. Il y distingue quatre formes cliniques :

- les états maniaques, avec l'hypomanie, la manie aiguë, les manies délirantes et confuses.
- les états dépressifs avec la mélancolie grave, la mélancolie délirante et paranoïde, accompagnée parfois d'hallucinations dans la forme dite « fantastique » avec délire hypocondriaque, idées de négation d'organes et la mélancolie confuse.

- les états fondamentaux où la variabilité de l'humeur persiste entre les accès, et peut les remplacer.

- les états mixtes où des états maniaques et dépressifs sont associés.

L'unité clinique de ces deux formes opposées dans une même pathologie a lieu dans la transition, dans le lien et dans la dynamique de succession des accès. L'observation de ces passages d'une affection à l'autre a donc permis d'organiser et de synthétiser cette pathologie, car « Après la mélancolie, il faut traiter de la manie qui a avec elle tant d'affinités que ces affections se changent souvent l'une de l'autre » (Willis 1695). Un autre argument en faveur de l'unité clinique de la maladie réside dans l'hérédité retrouvée du trouble : « Chez les membres d'une même famille, nous trouvons assez souvent l'une près de l'autre des folies périodiques ou circulaires bien caractérisées » (Kraepelin 1913). Dans sa classification, Emile Kraepelin distingue de manière exhaustive les signes psychiques des signes physiques, ainsi que des formes cliniques de la maladie. L'intérêt réside dans le fait que les signes psychiques et physiques ne sont pas scindés entre la manie et la dépression, ils sont unis dans un même chapitre où les caractéristiques objectives font souvent référence à l'accès maniaque délirant. Ainsi il conçoit que l'aperception, le pouvoir de fixation, l'inhibition de la pensée, la logorrhée, les idées délirantes, les troubles sensoriels, ..., sont des signes caractéristiques de cette pathologie.

De nos jours, l'unité clinique de cette affection n'est plus débattue mais sa dénomination a subi des modifications à l'image d'une étiologie et une nosographie concernant cette pathologie qui demeure complexe. Ainsi, ce trouble chronique de l'humeur n'est plus considéré comme une folie et/ou une psychose, mais s'intègre dans un trouble où les patients alternent des phases de dépression et de manie ou hypomanies qui, d'une part ne conduisent pas systématiquement à un délire et d'autre part sont entrecoupées de phases de rémissions euthymiques. Contrairement à la schizophrénie (Annexe II), le délire mélancolique ou maniaque est aigu mais il est intégré dans une maladie chronique qui n'a donc pas valeur de définition. Ainsi, dans les états maniaques, les signes essentiels sont la fuite des idées, l'humeur gaie et le besoin impérieux d'activité. Alors que les états dépressifs sont caractérisés par la tristesse ou l'angoisse et par la difficulté à penser et à agir.

Depuis les premières classifications de Kraepelin à nos jours, l'observation des critères physiques et psychiques « positifs » ont valeurs de référence, de fait, le diagnostic de trouble bipolaire se pose sur la présence d'un accès maniaque ou hypomaniaque avéré. Pour faciliter et étayer la description de ce trouble, les formes cliniques scindées entre le syndrome maniaque et la dépression permettent de le qualifier explicitement.

1.4.2. Les signes cliniques

Le syndrome maniaque est « primitif » dans les troubles bipolaires. Sa survenue est brutale avec rupture de l'état antérieur. Il est dominé par une exaltation, excitation de l'humeur caractérisée par une euphorie, une expansivité de l'humeur, une hypersyntonie, un ludisme, une hyperhédonie, une labilité émotionnelle et une irritabilité. De plus, les patients déclarent avoir une absence de sensation de fatigue (hypersthenie). Aussi, ce syndrome peut s'accompagner d'un délire maniaque où il y a une modification du contenu de la pensée avec un optimisme débordant, une surestimation de soi, un sentiment de toute puissance conduisant à un délire mégalomane ou mystique et un déni, une absence de conscience du trouble. Enfin, une accélération psychomotrice s'observe pendant l'accès avec une hypovigilance, une distractibilité, une fuite des idées qui deviennent diffluentes, illogiques et improductives, une logorrhée, une désinhibition comportementale (présentation débraillée, manifestation de joie) et pulsionnelle (multiplication des initiatives, désinhibition financière, comportements agressifs et à risque, hyperphagie) sans autocensure.

Dans l'état hypomane, on constate également une exaltation de l'humeur, mais son retentissement n'est pas assez marqué au niveau social ou professionnel pour nécessiter une hospitalisation. Dans le même sens, dans l'état hypomane il ne peut y avoir de délire caractérisé. La distinction entre les deux formes s'explique aussi par la durée de l'accès, qui est de quatre jours minimum dans l'état hypomane tandis qu'il est de sept dans l'état maniaque.

La dépression est aussi « primitive », « endogène » et majeure dans les troubles bipolaires. Sa survenue est brutale avec rupture de l'état antérieur, intense, d'expression mélancolique, et ne s'explique pas par des causes sociologiques ou médicamenteuses. Elle répond au moins à cinq critères énoncés ci-dessous, pour une durée minimale de quinze jours :

Elle est dominée par une tristesse intense non organisée et peu accessible au réconfort. Elle s'accompagne d'une perte de sensation de plaisir (anhédonie), une perte d'initiative, une anesthésie affective ou une irritabilité, jusqu'à une perte de l'élan vital. Au contraire du syndrome maniaque, dans la dépression, le patient éprouve une fatigue intense surtout en début de journée. De plus, le contenu de la pensée peut être interprété de manière erronée que ce soit dans le passé, le présent (culpabilité, indignité) ou l'avenir (pessimisme, incurabilité). Le patient souffre d'un ralentissement psychique dans l'attention, la concentration et le langage ; mais aussi d'un ralentissement moteur dans la gestuelle et les initiatives qu'il entreprend. Les conduites instinctuelles sont aussi modifiées concernant l'appétit, le sommeil et la libido qui sont globalement diminués. L'anxiété est un symptôme très fréquent associé à un épisode dépressif. Enfin, dans des cas sévères d'épisodes dépressifs où le fonctionnement global est très altéré, ils peuvent conduire à des délires sur des thèmes congruents à l'humeur.

Dans le manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux qui fait référence en psychiatrie, les troubles bipolaires sont réunis dans le chapitre C sous le nom de « troubles bipolaires et troubles connexes » (American Psychiatric Association 2013, Annexe I). On distingue six catégories de troubles dont le trouble bipolaire de type I, le trouble bipolaire de type II, le trouble cyclothymique, le trouble bipolaire associé à une autre affection médicale, le trouble bipolaire dû à un abus de substances et le trouble bipolaire non classé par ailleurs (Annexe I). Le diagnostic repose sur les aspects cliniques précédemment énoncés, auxquels la sévérité des accès peut aussi être évaluée en utilisant des grilles d'évaluation clinique (comme la *Patient Health Questionnaire 9* (PHQ-9) ou la *Clinical Global Impression* (CGI)).

Les formes « typiques » auxquelles on s'intéressera se concentrent sur les troubles bipolaires de type I et II. Dans les troubles bipolaires de type I, il y a une alternance d'épisodes dépressifs majeurs, typiquement mélancoliques et d'épisodes d'élévation de l'humeur dont au moins un épisode maniaque. A l'inverse, dans les troubles bipolaires de type II, on ne décèle pas d'épisode maniaque mais un épisode strictement hypomane. Comme nous avons pu le remarquer, la classification vaste et complexe est en perpétuel renouvellement, dès lors, des répercussions socio-économiques et pathologiques liées à ce retard de diagnostic constituent elles aussi un enjeu majeur de recherche pour les sociétés à venir.

1.4.3. Le trouble bipolaire est une question de santé publique majeure.

Cette affection chronique est fréquente car la prévalence mondiale des troubles bipolaires de type I est estimée entre 1 à 4% (Marion Leboyer and Kupfer 2010; Merikangas et al. 2007). Mais l'apparition du concept de spectre bipolaire et d'épisodes hypomanes a eu de fortes implications en matière d'évaluation et de prévalence du trouble. Actuellement, avec l'étendue des formes cliniques, la prévalence est estimée par certaines études entre 5 et 12% de la population générale considérant les formes atypiques de la maladie et 6,4% pour l'hypomanie (Marion Leboyer and Kupfer 2010).

Les conséquences sociologiques de cette affection sont considérables. En témoignent les études épidémiologiques de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) qui estime que les troubles bipolaires font partie des cinq maladies les plus invalidantes en nombre d'années de vie perdues et/ou vécues avec un handicap (Whiteford et al. 2013). Cette pathologie conduit à une surmortalité suicidaire mais aussi à un nombre de tentatives augmenté de quinze fois chez ces patients (Osby et al. 2001) et est à l'origine d'un dysfonctionnement social chez deux-tiers d'entre eux (Suppes et al. 2001). En effet, en France, 51% des sujets n'occupaient pas d'emploi rémunéré, 22% ne travaillaient qu'à temps partiel et seulement 16% avaient un travail à temps plein en 1992 (Romans and McPherson 1992; Shippee et al. 2011). La vie conjugale n'est pas épargnée car quatre patients sur cinq sont sujets à une séparation ou un divorce.

Ainsi, le coût économique de cette pathologie lié aux frais directement engagés pour traiter les patients mais aussi aux coûts indirects liés aux répercussions sociales du malade sont estimés à 200 milliards de dollars par an aux Etats-Unis (Dilsaver 2011).

Le diagnostic complexe, basé exclusivement sur les signes cliniques et l'appréciation du psychiatre, engendre un retard moyen du diagnostic de cinq à dix ans (Drancourt et al. 2013), ce qui favorise la survenue de comorbidités et explique l'importance de trouver des marqueurs biologiques objectifs.

Cette maladie psychiatrique touche autant d'hommes que de femmes, quel que soient leur origine socio-culturelle et leur niveau socio-économique.

Généralement, cette maladie débute chez le jeune adulte (entre 15 et 30 ans), mais elle peut se déclarer dès la puberté et jusqu'à un âge avancé. L'âge de début de la maladie est estimé en moyenne à 25 ans (Lin et al. 2006). Ainsi, dans le but d'identifier et de discriminer des sous groupes homogènes, il est possible de classer les troubles en

fonction de l'âge d'apparition des premiers épisodes thymiques. Des études ont permis de distinguer trois sous-groupes dont l'âge moyen d'apparition diffère de manière significative. On distingue un groupe avec un âge précoce d'apparition des premiers épisodes (17,6 ans), un groupe médian (24,6 ans) et un tardif (39,2 ans) (Bellivier et al. 2003). La distribution gaussienne de ces trois groupes a permis de définir un seuil à 21 ans pour les débuts précoces de la maladie (Figure I. 2). Cette configuration est commune quelque soient les régions géographiques étudiées (Bellivier et al. 2014), ce qui suppose que ce critère épidémiologique peut avoir une valeur nosographique pour étudier des traits communs dans ces différents sous-groupes. Or, les études cliniques sur ces différents sous-groupes ont montré que la sévérité des symptômes ainsi que l'héritabilité du trouble étaient maximales chez des patients ayant un âge d'apparition précoce de la maladie (Marian L. Hamshere et al. 2009).

Dans notre étude, nous nous intéresserons par la suite aux formes de troubles bipolaires à début précoce (TBDP), comme étant les formes les moins variables cliniquement, les plus sévères en termes d'épisodes psychotiques et les plus héréditaires.

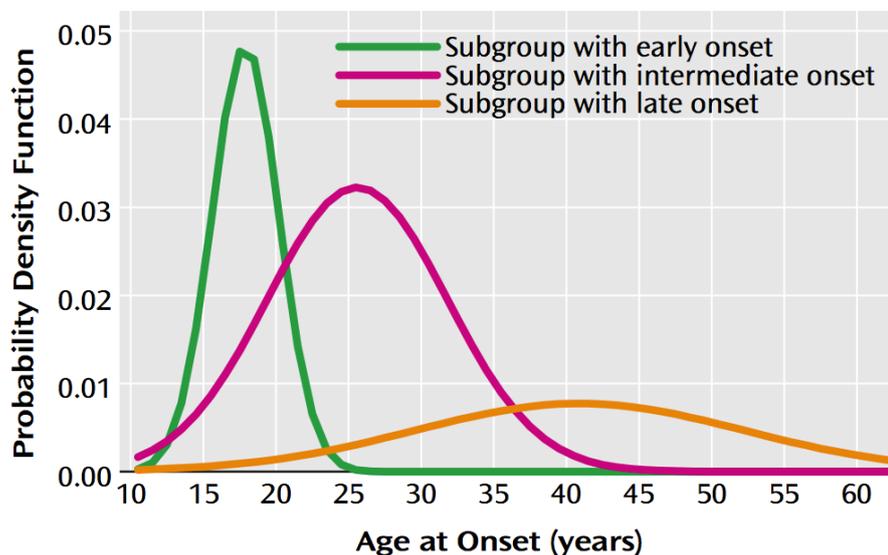


Figure I. 2. Distribution d'une population de patients avec un trouble bipolaire en fonction de l'âge d'apparition des premiers symptômes (Bellivier et al. 2003).

1.4.4. Traitement

Cette affection chronique demeure de nos jours incurable. Cependant, elle peut être stabilisée et accessible à un traitement prévenant les rechutes (prophylactique). De nos jours, les sels de lithium sont le traitement de référence prescrit en première intention dans le cadre des troubles bipolaires de type I (Dardennes, Lafuma, and Watkins 1999). Ce thymoregulateur découvert par John Cade en 1949, puis popularisé par Schou et Baastrup dans les années 70, est indiqué pour soigner les épisodes maniaques et dépressifs mais également pour les prévenir (Baastrup et al. 1970). Malgré une efficacité avérée dans la prévention des rechutes ainsi que la baisse d'intensité des épisodes (Geddes et al. 2004), un tiers des patients sont intolérants, résistants ou ont une mauvaise observance. De fait, la toxicité de cette molécule prescrite à des concentrations proches des doses létales demande un dosage régulier du lithium dans le sang (lithémie). Les traitements, sont souvent associés à des antiépileptiques ou prescrits en seconde intention en cas de mauvaise tolérance au lithium. Il s'agit principalement de la dépakine dont le valproate est dérivé mais aussi les carbamazépine. Enfin, des neuroleptiques atypiques de type aripiprazole ou olanzapine peuvent être utilisés pour traiter les phases aiguës de manie.

D'autres traitements non médicamenteux comme les psychothérapies, mais aussi la psychoéducation des patients sont des apports précieux pour compléter une prise en charge médicamenteuse et permettre sa réinsertion sociale. En effet, elles permettent de donner au patient et à son entourage un soutien pédagogique et psychologique pour gérer sa vulnérabilité. Assorties d'une bonne alliance thérapeutique, les psychothérapies permettent alors de contrôler la plupart des fluctuations thymiques en ambulatoire et d'éviter l'hospitalisation. La famille sera également sensibilisée au repérage des prodromes.

1.4.5. Evolution

Bien que l'avènement des thymorégulateurs et des neuroleptiques a permis d'établir un pronostic globalement positif des troubles bipolaires, la rechute est fréquente. En effet, la puissance de ces traitements chroniques, caractérisée par des effets secondaires nombreux, entraîne une mauvaise observance. A long terme, d'autres conséquences négatives peuvent survenir comme le suicide, les abus de substances toxiques ou des répercussions psychosociales. En effet, le lithium a un mode d'action qui reste à ce jour

inconnu au niveau moléculaire. De fait, son champs d'action étant très vaste, on n'explique pas son action thymorégulatrice et prophylactique.

L'enjeu est donc de pouvoir diagnostiquer plus tôt et de traiter ces patients dans un but curatif. Pour cela, à l'image des traitements proposés à ce jour (qui n'ont pas évolué depuis les années 70) il faut tenter de comprendre biologiquement et moléculairement les mécanismes qui conduisent à cette pathologie. Ainsi, dans une démarche empirique et scientifique, il faut s'atteler aux causes de la maladie pour en comprendre les conséquences visibles et par la suite les traiter.

Récemment, des auteurs ont remis en cause la dichotomie kraepelienne qui vise à scinder les troubles bipolaires et la schizophrénie (N. Craddock, O'Donovan, and Owen 2005). En effet, l'apparition d'une nouvelle catégorie diagnostique de patients schizo-affectifs a permis de rendre compte de patients ayant des « psychoses intermédiaires » entre ces deux pathologies (Kehrer F and Kretschmer E, 1924). Ainsi, l'apparition de cette nouvelle classe diagnostique, est le premier argument qui a interrogé sur ce clivage. De plus, l'apparition de nouvelles classifications au sein même des troubles affectifs a renforcé cette idée. En effet, les travaux de Kleist ou Angst visent à différencier les troubles bipolaires des troubles unipolaires (Kleist K, 1953; Angst J, 1966). Enfin, en terme d'évolution pronostique de la maladie, plusieurs études ont remis en cause l'idée kraepelienne selon laquelle l'évolution serait favorable dans le cadre des troubles bipolaires et déficitaire dans celui de la schizophrénie. Ainsi, de nos jours malgré une distinction diagnostique référencée dans le DSM-V, le modèle de continuum (Crow TJ, 1990), de spectre bipolaire (Angst J, 2007) ou de psychoses brèves (Marneros A and Akiskal HS, 2006) sont à prendre en considération pour nos recherches futures et interrogent sur l'étiologie des troubles bipolaires (Figure I. 3).

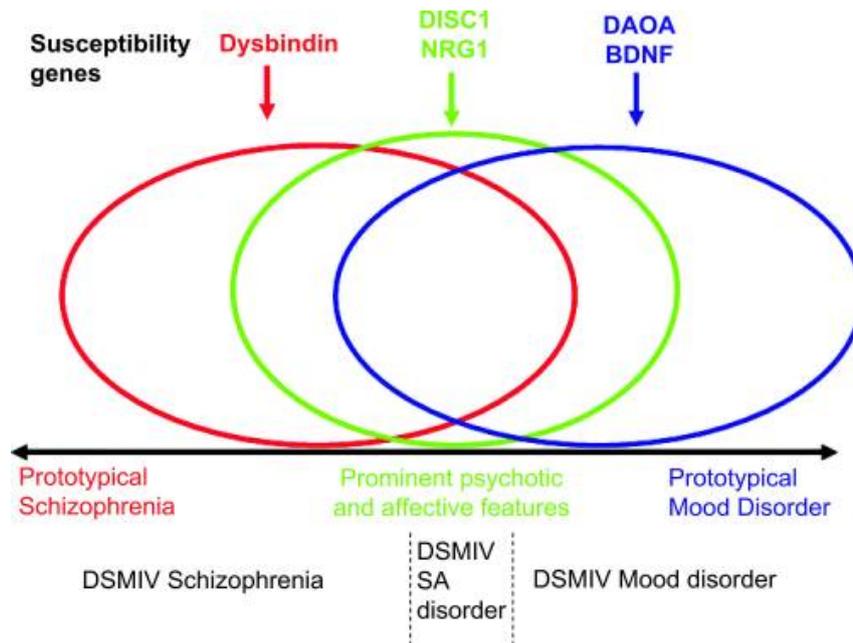


Figure I. 3. L'hypothèse génétique d'un continuum entre la schizophrénie et les troubles de l'humeur (Nick Craddock, O'Donovan, and Owen 2006).

A l'exemple de ce continuum clinique, l'étiologie de cette maladie demeure complexe. Malgré tout, chez l'ensemble des patients atteints de troubles affectifs de l'humeur, il doit exister des déficiences neurobiologiques relatives à la régulation des émotions. Ainsi, pour s'intéresser à l'étiologie d'un tel trouble, examinons d'abord comment ces émotions sont régies d'un point de vue neurobiologique.

C'est pourquoi, dans cette partie, nous allons tenter de mettre en lumière l'importance des émotions et des sens, dans la constitution de notre être, ainsi que des mécanismes cérébraux sous-jacents pour en comprendre nos motivations. Cette rhétorique non exclusive dans l'investigation des émotions par le biais de la neurobiologie et du cerveau (comme son acteur central), est un moyen « rationalisant » de comprendre, ce qui, par définition, ne l'est pas.

2. Neurobiologie des émotions

2.1. Cerveau et émotions

2.1.1. Définition d'une émotion

Une émotion a deux composantes : la caractéristique physique d'une sensation mais aussi le ressenti par rapport à un stimulus (état d'âme). Pour exemple, je peux ressentir de l'étonnement en étant surpris et avoir mon cœur qui accélère en réponse à cet étonnement. On peut ainsi se demander, d'un point de vue neurobiologique, quelle est la cause première et quelle en est la conséquence ? Et pourquoi alors un même terme est employé pour qualifier ces deux états ? Cette dimension double de l'émotion est médiée par des circuits neuronaux distincts, ainsi le ressenti, active des aires corticales, cingulaires et frontales, alors que son expression physique active des circuits sous-corticaux, périphériques, autonomes, endocriniens et moteurs. Pour comprendre les émotions, nous devons ainsi comprendre cette dualité, ses relations et leur chronologie. Pour cela, plusieurs théories ont émergé.

2.1.2 Neurobiologie anatomique des émotions

Jusqu'à la fin du XIXème siècle, la vision traditionnelle de l'évocation d'une émotion s'opérait dans un schéma où l'activité cognitive initie une réponse réflexe autonome ; mais en 1884 le psychologue William James proposa, à l'inverse, que l'expérience émotionnelle ne pouvait être que le fruit d'une réponse physique (W. James 1884). Cette théorie peut se traduire par le fait que l'expression de nos émotions n'est qu'une retranscription de la réception de signaux corticaux (je vois un ours, mon cœur palpite, ces informations sont envoyées au cerveau qui le traduit par de la peur). En effet, des patients paraplégiques ayant des lésions du système nerveux autonome, décrivent aussi des problèmes dans l'expression des émotions. Malgré tout, cette théorie ne permet pas d'expliquer que des émotions peuvent être ressenties sans stimuli rationnels mais seulement de part leur évocation, ou que l'expression d'une émotion peut perdurer bien après les changements physiologiques, ou même qu'une émotion peut s'exprimer avant les changements physiologiques.

En 1920, Walter B Canon montra grâce à ses études réalisées sur des ablations corticales de cerveaux de chats qu'une émotion intense entraînait une réponse d'urgence

autonome (*fight or flight* response). D'un point de vue neurobiologique, il suggéra l'implication du système nerveux sympathique autonome agissant de manière aspécifique et quasi manichéenne sur l'ensemble du cortex (W. B. Cannon 1987). De plus, ces travaux couplés avec ceux de Philip Bard, mirent en évidence l'importance sous-corticale de l'hypothalamus dans la médiation cognitive et périphérique des émotions (Bard 1928). En effet, dans ses expériences d'ablations stéréotaxiques de sous-structures de l'hypothalamus, Walter Hess montra que celles-ci provoquaient une multitude de réponses émotives autonomes. Ainsi, l'hypothalamus n'est pas seulement un noyau pour la réponse nerveuse autonome, mais plutôt un organisateur/coordonateur de cette réponse (Hess 1954).

Le lien entre hypothalamus et cortex se fait par l'intermédiaire du système limbique. La signification des réactions autonomes conduites par l'hypothalamus sont représentées au cortex par des connexions afférentes *via* le système limbique. Ainsi, le néocortex influence l'hypothalamus grâce à des connexions avec le gyrus cingulaire et du gyrus cingulaire à l'hippocampe dans un système fermé énoncé par Papez (Figure I. 4), où l'information retourne au gyrus cingulaire par l'intermédiaire des corps mamillaires (Papez 1995). Ces circuits neuronaux ont par la suite été complétés par Paul MacLean (Maclean 1955).

Dans les années 1950, Lawrence Weiskrantz étudie le syndrome de Kluver-Bucy dans lequel les patients souffrent entre autres de troubles dans la gestion des émotions. Elle observe, dans un modèle de conditionnement à la peur, que des singes avec des lésions au niveau de l'amygdale n'apprennent pas à éviter un choc aversif. Elle conclut ainsi que l'amygdale sert de lien pour la perception de stimuli extérieurs associés à des émotions (comme la peur) mais aussi pour réagir aux conséquences aversives qu'elle engendre (Weiskrantz 1956). Les travaux utilisant un modèle Pavlovien de conditionnement à la peur, permettent de mettre en évidence cette structure comme permettant l'apprentissage des émotions associées à des stimuli extérieurs dans le but d'éviter des conséquences aversives (LaBar et al. 1998). Mais aussi dans le cadre d'émotions positives, l'amygdale semble jouer un rôle dans la reconnaissance des émotions et donc dans leur production appropriée.

Enfin, les années 60 voient émerger l'importance de l'environnement et du contexte social dans la perception des émotions. Ainsi Stanley Schachter, affine la théorie de

James-Lange en plaçant l'individu dans ses attentes et donc dans une forme de mémoire émotive pour les exprimer à bon escient et avec une intensité adéquate (Schachter 1964). De fait, on peut concevoir une émotion comme une histoire que le cerveau construit pour expliquer les réactions autonomes du corps (pression artérielle, rythme cardiaque etc.) (Damasio 1999).

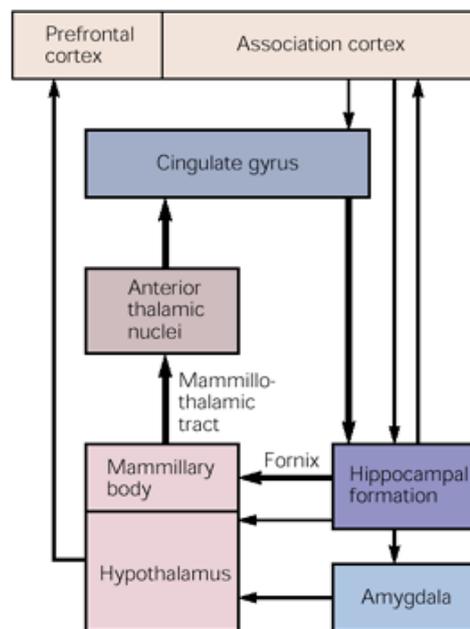


Figure I. 4. Le circuit neuronal d'une émotion de Papez, étendu par Paul MacLean (Kandel, Schwartz, and Jessell 2000).

Le circuit de Papez est indiqué avec les flèches en gras, de nouvelles connexions ont depuis pû être établies.

Ce qui anime cette recherche est la compréhension des mécanismes neurobiologiques qui sont impliqués dans la régulation de nos émotions.

Après avoir brièvement décrit d'un point de vue anatomique les circuits et les zones cérébrales impliquées dans la régulation de nos émotions, passons aux modulateurs neuronaux moléculaires de notre cerveau émotif. La régulation de ces fonctions complexes fait appel à des systèmes de neurones ayant des projections axonales à longue distance et qui se définissent grâce aux neurotransmetteurs qu'ils libèrent.

Ainsi, dans le cadre de la dépression il a été démontré que les systèmes sérotoninergiques, noradrénergiques ou des facteurs neurotrophiques sont impliqués dans ces dysfonctionnements, tandis que des molécules thymoregulatrices permettent de réguler l'humeur.

2.2. Neurobiologie moléculaire des émotions

2.2.1. La sérotonine

Le système sérotoninergique cérébral tient son origine dans les noyaux du raphé, situés dans le Pons. Le noyau rostral du raphé projette de manière diffuse sur un large groupe d'axones dans le néocortex, le système limbique et le cervelet ; au contraire, le noyau caudal projette de manière descendante vers le cervelet et dans la moelle épinière (Figure I. 5). L'action de ce système est médiée par la sérotonine (5-hydroxytryptamine, 5-HT) qui est un acide polyprotique contenant deux sites d'ionisation greffés sur un noyau indole : un groupement amine primaire porté par une chaîne aliphatique éthyle branché en position 3 et un groupement hydroxyle branché en position 5.

Bien que de grandes quantités de tryptophane soient présent dans l'alimentation (Essman 1979) , la majeure partie est catabolisée lors du passage de la paroi intestinale, le reste étant catabolisé par le foie et les poumons . Dans les cellules enterochromaffines et les neurones sérotoninergiques, la sérotonine est synthétisée à partir du tryptophane. Cette voie de biosynthèse est normalement mineure chez les mammifères (1 à 2% du tryptophane) par rapport à la production d'acide nicotinique.

Le tryptophane est d'abord hydroxylé en 5-hydroxytryptophane (5-HTP) par la tryptophane hydroxylase (TPH) dont il existe deux isoformes : TPH-1 et TPH-2. Cette hydroxylation en 5 du tryptophane constitue l'étape limitante de la biosynthèse de la sérotonine de part son rétrocontrôle par les indolamines. Le 5-HTP est ensuite décarboxylé en serotonine par une décarboxylase des acides aminés aromatiques (AADC) responsable aussi de la décarboxylation de la dopamine.

La quantité de sérotonine synthétisée par jour est à peu près équivalente à celle présente dans l'organisme. Son temps de renouvellement est estimé à 1h dans le cerveau.

Chez les mammifères, la dégradation principale de la sérotonine produit de l'acide 5-hydroxy-indole acétique (5-HIAA) grâce à une désamination par les monoamines oxydases (MAO) puis une oxydation grâce à une aldéhyde déshydrogénase (ALDH). La sérotonine permet son action en activant les récepteurs sérotoninergiques qui sont classiquement répartis en sept groupes. La plupart sont métabotropiques, couplés à une protéine G pour la transduction du signal. A ce jour, seul un récepteur a été identifié comme étant ionotropique : le 5-HT (Barnes et al. 2009).

D'un point de vue pharmacologique, l'ensemble des cibles visant à augmenter la concentration de sérotonine à la synapse à un effet antidépresseur. En effet, l'action sur l'inhibition de la recapture des vésicules en sérotonine (IRSS) ou sur la monoamine oxydase et sur l'activation des récepteurs 5-HT_{1a} permet d'augmenter la concentration plasmatique en 5-HT. Réciproquement, l'inhibition de la tryptophane hydroxylase ou le blocage du chargement vésiculaire par la réserpine à un effet physiologique déprimant (Figure 5). Bernard Brodie mis en évidence que l'action de la réserpine (initialement employé comme traitement de l'hypertension artérielle) provoquait des syndromes dépressifs chez 15% des patients en diminuant le taux de sérotonine et de noradrénaline cérébraux, de fait la réserpine inhibe le chargement des vésicules synaptiques en neurotransmetteurs (Brodie, Shore, and Silver 1955).

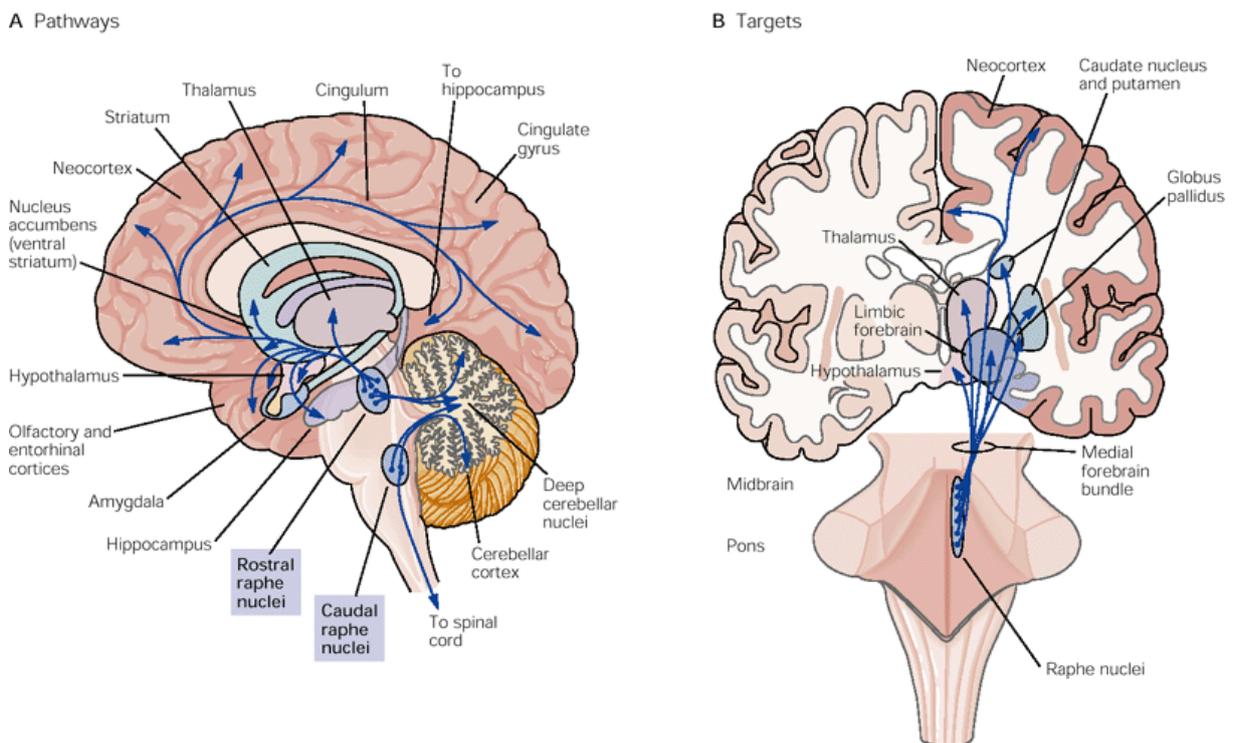


Figure I. 5. Le système sérotoninergique (Heimer, 1995)

- A) Vue sagittale, avec des afférences partant des noyaux du raphé rostral et caudal
- B) Vue coronale, avec les cibles majeures des neurones sérotoninergiques

2.2.2. La noradrénaline

La noradrénaline (NA ou *norépinéphrine*) est une neurohormone adrénergique appartenant à la famille des catécholamines tout comme la dopamine ou l'adrénaline. Elle est libérée dans le système nerveux central, mais aussi en faible quantité, en tant qu'hormone, par les cellules chromaffines des glandes médullosurrénales.

Le système noradrénergique trouve son origine dans le *locus coeruleus* (partie rostrale du Pons), dont les axones projettent de manière ascendante sur le cortex cérébral, l'hypothalamus, l'hippocampe et le cervelet. D'autres neurones provenant de l'aire tegmentale latérale du Pons ont des afférences descendantes (Figure I. 6).

Cette neurohormone semble être impliquée dans la production des émotions comme la peur, le plaisir et la motivation positive. Ainsi, une dérégulation de ce système peut aussi être corrélée avec une humeur dépressive.

En effet, les mêmes molécules utilisées pour leur qualité d'antidépresseurs ont des cibles d'action concertées sur les systèmes sérotoninergiques et noradrénergiques.

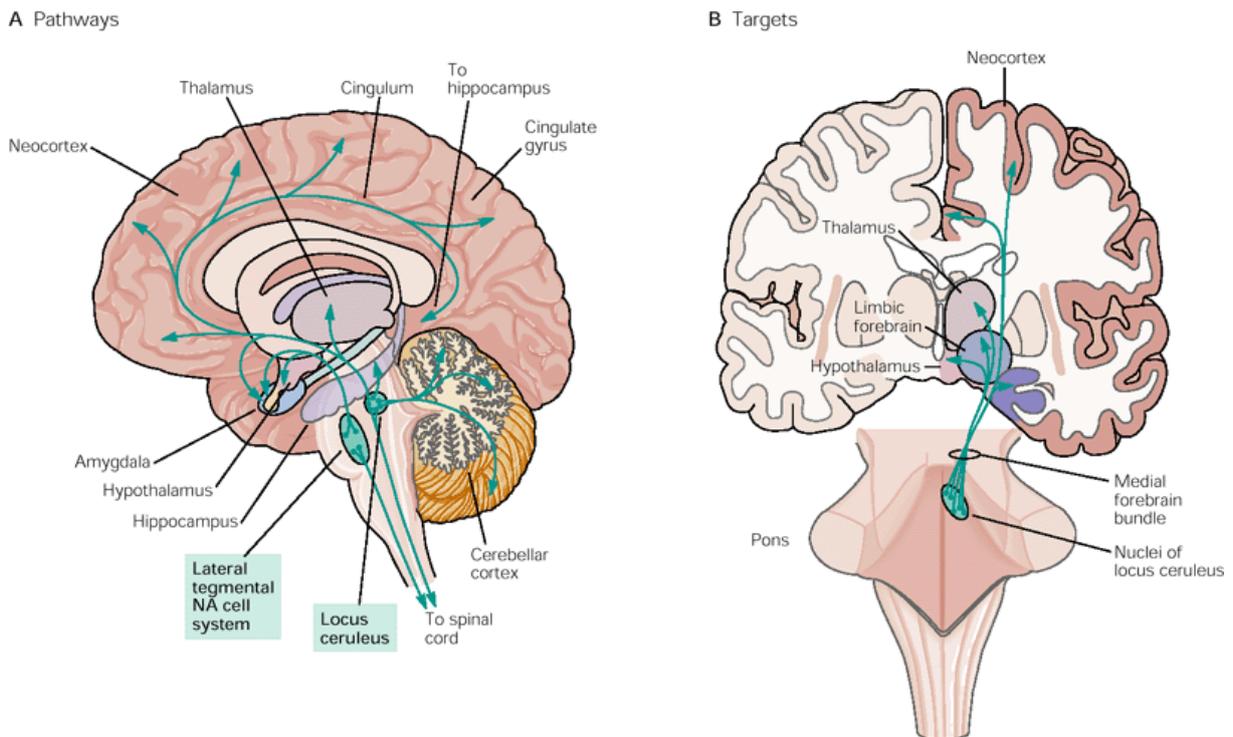


Figure I. 6. Le système noradrénergique (Heimer, 1995)

- A) Vue sagittale, avec des afférences principales partant du locus coeruleus et de l'aire tegmentale ventrale.
- B) Vue coronale, avec les cibles majeures des neurones noradrénergiques.

2.2.3. Hypothèse biogénique des amines

La mise en évidence de l'implication de ces deux neurohormones dans la régulation des émotions à donné lieu à une hypothèse biogénique des amines simpliste, qualifiant la dépression comme un manque de sérotonine et de noradrénaline synaptique ; contrairement aux accès maniaques qui seraient dûs à une hyper-activation des systèmes noradrénergiques (Figure I. 7). Or, malgré l'efficacité avérée des inhibiteurs de recapture de sérotonine, des inhibiteurs de la monoamine oxydase, des tricycliques ou des agonistes des récepteurs sérotoninergiques dans la dépression; cette hypothèse ne permet pas d'expliquer certains phénomènes cliniques. En effet, la connaissance précise des cibles thérapeutiques et cinétiques d'action des tricycliques ne permet pas de comprendre le temps relativement long de réponse clinique à ces molécules. De plus il a été montré que chez certains patients dépressifs, les taux de noradrénaline étaient augmentés dans le plasma et que le même traitement agissait cette fois en diminuant le niveau de noradrénaline.

Ainsi, l'hypothèse mécanistique de perturbation aminergique dans les pathologies liées à l'humeur doit être contextualisée dans un système complexe qui est le cerveau, et ce à différents niveaux. Tout d'abord d'un point de vue clinique : les maladies de l'humeur ne peuvent constituer qu'une seule entité et sont associées à d'autres pathologies. Deuxièmement, d'un point de vue endocrinologique : une variété de neurotransmetteurs peut être impliquée dans la dépression. Enfin, d'un point de vue mécanistique on sait maintenant que les différents systèmes neuronaux agissent en concertation et non de manière indépendante à un certain locus.

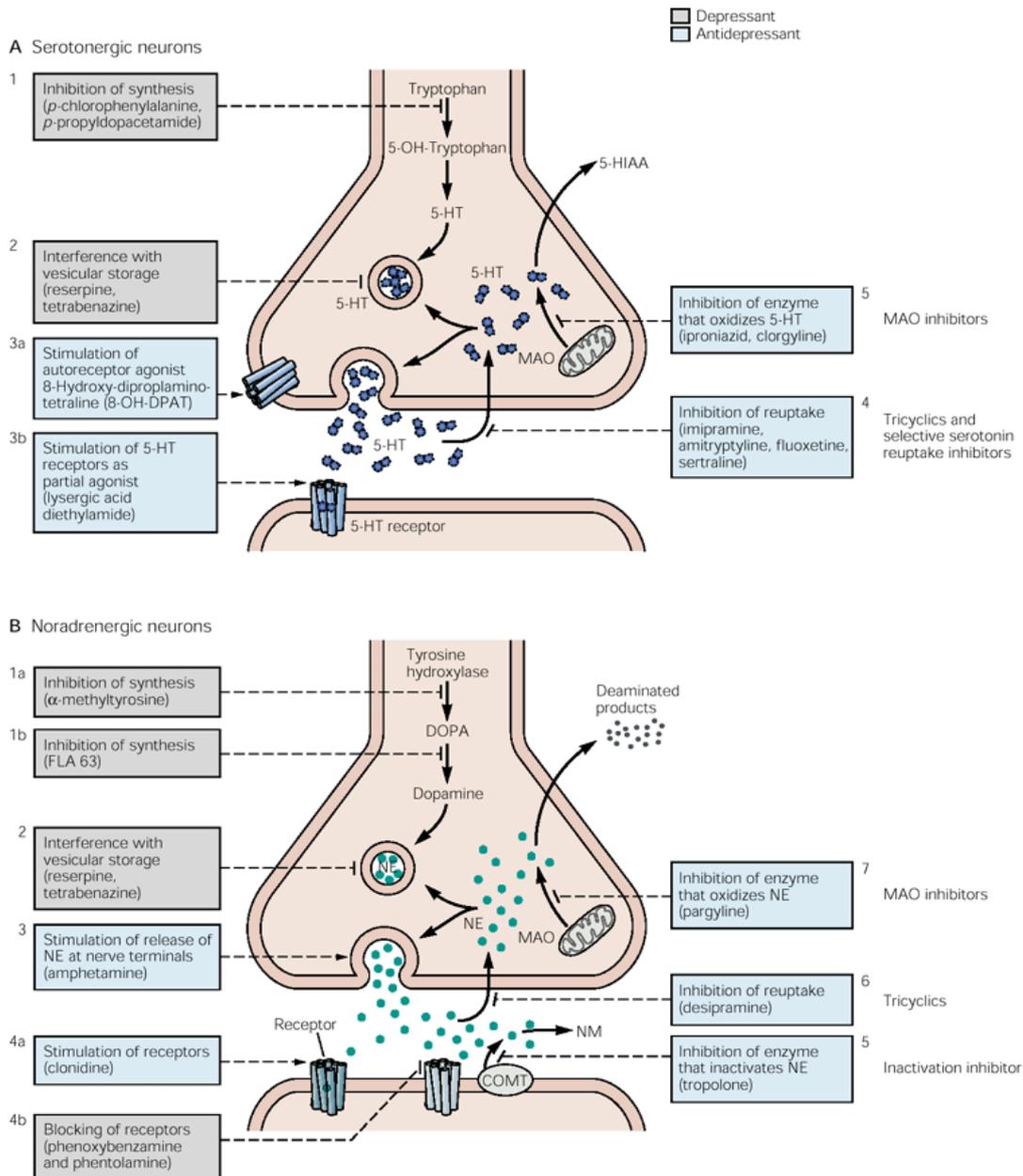


Figure I. 7. Action des antidépresseurs sur les systèmes sérotoninergique et noradrénergique (Kandel, Schwartz, and Jessell 2000)

2.2.4. Le lithium

Cette complexité dans la compréhension physiopathologique des maladies psychiques liées à l'humeur s'illustre parfaitement par le traitement chronique basé sur des sels de lithium, administrés comme premier choix thérapeutique pour stabiliser les patients maniaco-dépressifs. En 1949, le psychiatre John Cade remarque que le lithium est efficace dans le traitement des épisodes maniaques comme stabilisateur d'humeur et

que le traitement chronique par ce cation a un effet prophylactique pour la prévention et l'atténuation des accès maniaques et dépressifs chez des patients maniaco-dépressifs. Cette molécule trouve son efficacité dans la transduction du signal au niveau post synaptique en inhibant l'enzyme inositol 1-phosphatase qui permet de recycler l'inositol. Ainsi, dans les neurones avec des récepteurs métabotropiques liés à une protéine G, la cascade de signalisation post-synaptique permettant l'activation du second messenger pour la libération du calcium endoplasmique est inhibée. Malgré tout, ce mode d'action largement présent dans un grand nombre de types neuronaux pour la communication intercellulaire, ne permet pas de comprendre la spécificité de cette molécule en tant que thymorégulateur (Figure I. 8).

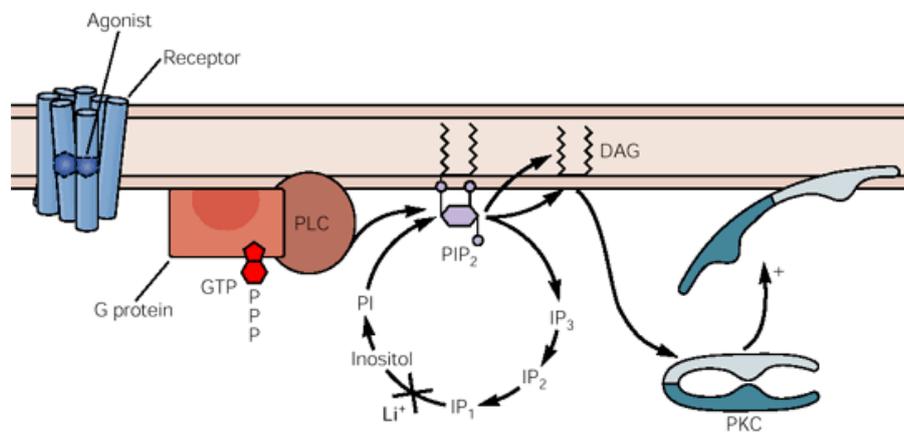


Figure I. 8. Mode d'action du lithium (Kandel, Schwartz, and Jessell 2000)

2.2.5. Le stress

Comme énoncé précédemment les pathologies liées à l'humeur ne peuvent se concevoir dans une nosographie simpliste et relèvent souvent d'une multitude de symptômes associés. C'est en ce sens que ces maladies multifactorielles restent encore mal comprises, mais aussi puise leur intérêt de recherche scientifique. Car, si on ne sait pas situer les comorbidités dans un schéma conduisant à la maladie (comme l'anxiété), on peut cependant traiter celles-ci pour espérer comprendre et/ou soigner la maladie.

En effet, Edward Sachar montra que des patients déprimés présentaient des anomalies hypothalamiques. Dans le cadre des dépressions sévères, l'hypophyse sécrète un excédant d'hormone adrénocorticotrope (ACTH), conduisant à un excédant de cortisol sécrété par les glandes surrénales (Sachar 1977). Philip Gold montra que

l'excédant de cortisol sécrété chez les patients déprimés résultait d'un excédant de corticolibérine (CTRH) libéré par l'hypothalamus (Gold et al. 1995). Enfin, expérimentalement il a été montré que la libération de CTRH est stimulée par la norépinéphrine et que le taux de CTRH est corrélé avec un état d'anxiété élevé.

Ainsi, on peut suggérer que les systèmes noradrénergique et hypothalamo-hypophysaire se renforcent mutuellement, et que l'anxiété pourrait être une comorbidité/ un symptôme de la dépression. En effet, 40% des patients résistant à la dexamétasone (molécule qui inhibe l'ACTH) souffrent de dépression sévère.

Cette hypothèse hypothalamo-hypophysaire à l'origine des épisodes dépressifs majeurs a été reprise par Charles Nemeroff, qui testa l'effet du stress chez l'animal. Les études corroborent que, quelque soit la nature du stress (de contrainte, de défaite sociale ou modéré chez la souris) celui-ci est considéré comme un facteur renforçant la survenue d'un épisode dépressif (Marmigère et al. 2003; J. Alfonso et al. 2006).

De plus, le stress intervient dans la régulation spatiale du *Brain Derived Neurotrophic Factor* (BDNF). Il s'accompagne d'une diminution de la transcription du BDNF dans l'hippocampe (Nibuya, Morinobu, and Duman 1995; Ueyama et al. 1997) ou l'hypothalamus (M. A. Smith et al. 1995) et un traitement antidépresseur chronique corrige ce phénotype (Nibuya, Nestler, and Duman 1996). On peut dès lors penser que si des inhibiteurs de la recapture de la sérotonine sont impliqués dans l'expression du BDNF, il existe alors un lien étroit entre ce facteur neurotrophique et cette neurohormone. Ainsi l'équipe de Ron Duman proposa un modèle d'action des antidépresseurs sérotoninergiques impliquant l'expression post-synaptique du BDNF dans l'hippocampe adulte. Ce modèle prévoit l'activation de la cascade de signalisation de l'AMP_c au niveau des récepteurs 5HT_{4,6,7} en présence d'un IRSS, conduisant à l'activation du facteur de transcription dépendant de l'AMP_c (*cAMP Responsive Element Binding Protein*=CREB) qui se fixe sur une séquence *cAMP Responsive Element* (CRE) pour l'activation de la transcription du BDNF. En effet, chez des souris mutantes pour le facteur de transcription CREB, un traitement avec un IRSS n'entraîne pas d'augmentation de la transcription du BDNF (Conti et al. 2002). De même que, des souris mutantes conditionnelles pour le gène codant le BDNF dans l'hippocampe sont insensibles à un traitement antidépresseur à la désipramine après un test de nage forcée (Monteggia et al. 2004). À l'inverse, des souris recevant une injection stéréotaxique de

BDNF présentent une augmentation de l'arborisation dendritique des neurones sérotoninergiques dans le cortex (Mamounas et al. 2000).

Tous ces arguments neurobiologiques laissent à penser que le cerveau et les modulateurs qui interviennent dans la production de nos émotions sont des cibles majeures pour comprendre et traiter les pathologies liées à l'humeur. L'humeur est la transcription de la conscience humaine, elle est expressive et représente sincèrement nos traits de caractère. Ce terme intimement lié à la notion d'émotion n'en est qu'une généralité. Elle se distingue de l'émotion dans la temporalité, car si l'émotion est passagère, l'humeur est globale et par conséquent moins sujette à des qualificatifs. Doit-on appréhender la notion d'humeur comme la résultante d'états émotifs passagers ?

La réponse affective qualifiant l'humeur est une émotion qui peut s'étendre de l'euphorie à la tristesse en passant par la surprise, la déception ou l'énervement. Mais seulement deux de ces états sont qualifiés de pathologiques dans le temps ; il s'agit de l'euphorie et de la dépression. L'étiologie de cette maladie (comme l'ensemble des maladies psychiatriques) est complexe. Elle est déterminée par un ensemble de facteurs intégrant une forme de vulnérabilité et une sensibilité au stress. Contrairement à des maladies somatiques, cette maladie de l'humeur ne peut trouver une explication purement biologique, mais une combinaison de facteurs génétiques prédisposant et de facteurs environnementaux. Il reste à déterminer désormais quelle est la part de biologie et d'hérédité dans cette maladie multifactorielle ?

En tout cas, la génétique n'a pas pour vocation d'expliquer le psychè ni le trouble bipolaire dans sa globalité, mais reste une approche scientifique pour tenter de mieux comprendre moléculairement les troubles neurologiques survenant chez ces patients afin d'en trouver un traitement spécifique. En effet, l'hypothèse serait que le « fond » génétique des patients les rendrait plus vulnérables aux aléas environnementaux stressants pour déclencher une maladie lorsque le seuil de susceptibilité serait franchi.

A ce jour, la physiopathologie de cette maladie reste inconnue et aucun marqueur biologique n'a vraiment pu y être associé. La difficulté réside dans le fait que l'hérédité dans les maladies psychiatriques est complexe, la corrélation entre le génotype et le phénotype n'est pas directe et n'obéit pas aux lois de Mendel. Malgré tout, les études épidémiologiques permettent d'apporter des preuves de l'implication des facteurs génétiques dans l'étiopathologie des maladies psychiatriques.

3. Génétique des troubles bipolaires

Avant même les premières descriptions de la maladie comme une entité nosographique, Lorry décrivait en 1765, dans son traité sur la mélancolie (Lorry 1765), l'hérédité parmi les cinq causes possibles de manies mélancoliques pour les différencier des mélancolies pures. Par la suite, Falret en 1854 conçoit l'hérédité comme une cause possible de cette forme de « folie circulaire ».

Depuis, de nombreuses études ont apporté des preuves de l'existence d'une contribution génétique dans la vulnérabilité aux troubles bipolaires.

3.1. Epidémiologie des troubles bipolaires

Des études génétiques montrent que le risque d'avoir un trouble bipolaire est proportionnel au degré d'apparentement (N. Craddock and Jones 1999). En effet, la fréquence du trouble bipolaire dans la population générale est estimée entre 0,5 et 1,5%, alors que le risque pour un apparenté de premier degré est de 5-10% correspondant à un risque relatif $\lambda_s=8$. Ce risque diminue avec l'augmentation du degré de parenté mais reste supérieur à celui de la population générale. Le risque de survenu d'un trouble bipolaire, est d'autant plus élevé que les apparentés déclarent un trouble bipolaire à début précoce comparé à un trouble bipolaire à début tardif (Rice et al. 1987; Strober et al. 1998).

3.1.1. Etudes de jumeaux

Les études de jumeaux permettent de discriminer entre la part génétique et la part environnementale du trouble. Ces études ont permis d'estimer un taux de concordance de 40% pour déclarer un trouble bipolaire entre des jumeaux monozygotes (qui partagent 100% de leurs gènes), alors qu'il n'est que de 5% chez des dizygotes (qui partagent 50% de leur patrimoine génétique) (Kieseppä et al. 2004; McGuffin et al. 2005). Ainsi, l'héritabilité dans les troubles bipolaires est d'environ 60 à 80% selon les études, alors que l'environnement contribuerait à hauteur de 40% environ (Lichtenstein et al. 2009, Figure I. 9).

3.1.2. Etudes d'adoption

Les études d'adoption offrent un autre moyen de dissocier la composante génétique de la composante environnementale familiale postnatale. Un risque relatif élevé pour un trouble parmi les sujets adoptés et les parents adoptifs, suggère un facteur environnemental partagé. Au contraire, un risque similaire parmi les sujets adoptés et les parents biologiques suggère une influence génétique. Les études d'adoption dans les troubles bipolaires rapportent un risque relatif de 4,3 d'avoir la maladie chez les enfants adoptés quand les parents biologiques sont malades et un risque relatif de 1,3 quand les parents adoptifs sont malades (Smoller and Finn 2003). De manière générale, les apparentés de patients avec un trouble bipolaire présentent un risque plus élevé de déclarer une maladie psychiatrique comme la dépression unipolaire ou la schizophrénie (Gershon et al. 1982; Smoller and Finn 2003).

L'étude la plus récente et la plus vaste, réalisée sur plus de 2 millions de familles suédoises, met en évidence une forte association génétique entre le trouble bipolaire et la schizophrénie. En effet, si un patient a un trouble bipolaire, le risque de déclencher une schizophrénie dans une même famille est multiplié par deux. Cette étude estime ainsi que la part génétique partagée entre les deux troubles est de 40% et que les facteurs environnementaux partagés sont seulement de 3 à 6%. Ces résultats montrent que les troubles bipolaires et la schizophrénie partagent des facteurs génétiques communs ce qui, une fois de plus, remet en question la dichotomie classique entre les deux pathologies (Lichtenstein et al. 2009).

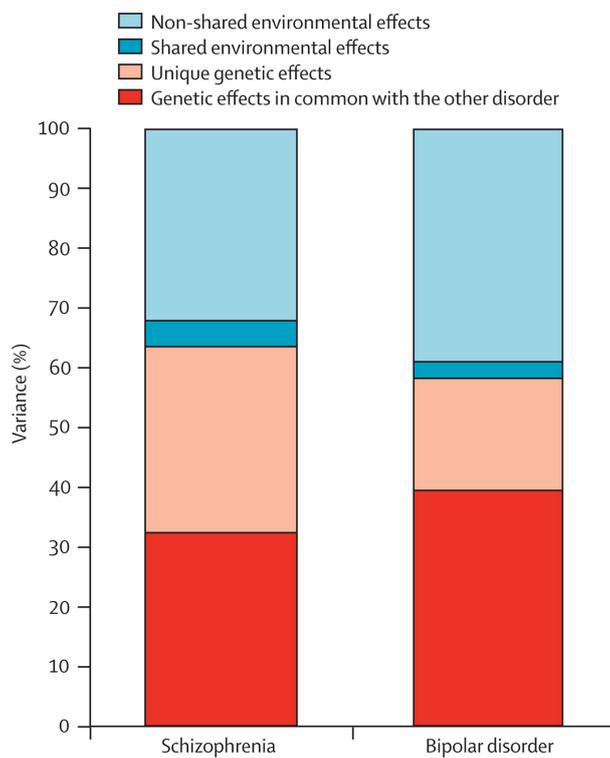


Figure I. 9. Épidémiologie de la variance calculée pour la part génétique et environnementale partagée ou non dans la schizophrénie et les troubles bipolaires. (Lichtenstein et al. 2009)

L'essor de la biologie moléculaire a fourni à la biologie un outil puissant pour identifier les variations génétiques impliquées dans la vulnérabilité aux maladies psychiatriques. Les approches utilisées ont été dépendantes des innovations technologiques. Je vais donc essayer de présenter de manière non exhaustive les différentes approches génétiques qui permettent de mieux comprendre les mécanismes biologiques à l'origine des troubles bipolaires.

3.2. Etude d'association génétique dans les troubles bipolaires

3.2.1. Analyse de gènes candidats

Avec l'évolution des technologies et l'avènement du séquençage à haut débit un grand nombre de gènes candidats ont été étudiés dans les troubles bipolaires. Les premières études se concentraient sur des gènes *a priori* candidats, en fonction de leur caractérisation physiologique, de leur profil d'expression ou de la région génomique dans laquelle ils étaient localisés. Ainsi, un grand nombre d'études se sont concentrées sur des gènes codant des molécules impliquées directement ou indirectement dans les mécanismes d'action des thymorégulateurs.

Les antidépresseurs agissent sur les voies de synthèse ou de dégradation de neurotransmetteurs comme la sérotonine (Middlemiss, Price, and Watson 2002). Dès lors, des gènes codant la monoamine-oxydase A (*MAOA*) ou le transporteur de la sérotonine (*SLC6A4*) ont largement été associés aux troubles bipolaires. Malgré tout, à ce jour il n'existe pas de résultats clairs permettant d'attribuer la susceptibilité du trouble à un allèle donné.

Le gène *SLC6A4* code une protéine, SERT (*Serotonin transporter*), qui intervient dans la recapture de la sérotonine libérée dans la fente synaptique, afin de la recycler et la rendre disponible pour un nouveau cycle. Ce transporteur a été particulièrement étudié car un polymorphisme correspondant à une insertion ou une délétion de 48 nucléotides au niveau de son promoteur a été fréquemment retrouvée. Ce polymorphisme influe sur le taux d'expression de ce gène, sur la quantité de protéines exprimée et donc sur la capacité de capture de sérotonine (Lesch et al. 1996). Les formes courtes ont été associées aux troubles bipolaires à début précoce ou aux troubles bipolaires avec des symptômes psychotiques (Collier et al. 1996; Ospina-Duque et al. 2000). Plus de 17 études d'association ont ainsi cherché à déterminer si l'allèle portant la forme courte ou

longue était plus fréquemment retrouvée chez des personnes avec un trouble bipolaire par rapport à des témoins (Cho et al. 2005). L'ensemble des études décrit des résultats contradictoires du fait du manque de reproductibilité des études. Cependant, une méta-analyse regroupant 1712 patients et 2583 témoins montrait un effet significatif, avec un facteur de risque augmenté de 1,12 fois pour les individus portant l'allèle court, de présenter des troubles bipolaires. De manière intéressante, les auteurs remarquent un effet additif lorsque ce polymorphisme est combiné avec d'autres loci de susceptibilité (Cho et al. 2005).

Dans notre laboratoire, nous avons pu identifier une variation fréquente dans le promoteur du gène *SNAP25*, codant une protéine nécessaire au mécanisme de libération des neurotransmetteurs. Cette variation est spécifiquement associée aux formes à début précoce de troubles bipolaires et induit une augmentation de l'expression du gène dans le cortex préfrontal (B. Etain et al. 2010). Une autre étude antérieure avait mesuré grâce à des marquages immunologiques l'expression de *SNAP25* dans différentes régions de l'hippocampe de patients avec des troubles bipolaires, elle avait montré que l'expression de cette protéine était significativement réduite dans le *stratum oriens* de l'hippocampe chez des patients bipolaires comparée à des contrôles (Fatemi et al. 2001).

Malgré tout, à l'image de la nosographie clinique, des études génétiques retrouvent des associations entre plusieurs maladies psychiatriques, notamment la schizophrénie et les troubles bipolaires. Ainsi, le gène *DAOA* initialement associé à la schizophrénie, a été montré comme étant associé aux troubles bipolaires dans cinq études indépendantes (E. Hattori et al. 2003). Mais la méta-analyse sur des populations schizophrènes et bipolaires n'a pas confirmé cette association avec les troubles bipolaires (Müller et al. 2011). On pourrait aussi citer le gène codant la neurologine 1, la *COMT*, le *BDNF*, *DISC1*, *DRD4* et bien d'autres qui ont tous été associés aux troubles bipolaires mais dont la significativité et la reproductibilité de ces études restent faibles, (Schulze and McMahon 2003) (Tableau I. 1)

Tableau I. 1 Meta-analyse non exhaustive des principaux gènes candidats associés aux troubles bipolaires.

Gène	Symbole	Etudes et Meta-analyses	Niveau d'évidence
Serotonin Transporter	<i>SLC6A3</i>	Anguelova et al. 2003	+++
D-amino acid oxidase activator (G72)	<i>DAOA</i>	Detera-Wadleigh & McMahon 2006	+++
Brain-derived neurotrophic factor	<i>BDNF</i>	Kanazawa et al. 2007 Fan & Sklar 2008	+++
Disrupted-in-schizophrenia-1	<i>DISC1</i>	Hodgkinson et al. 2004; Thomson et al. 2005 ; WTCCC 2007 ; Perlis et al. 2008	++
Tryptophan hydroxylase 2	<i>TPH2</i>	Harvey et al. 2004 ; Van den Bogaert et al. 2006 ; Lopez et al. 2007 ; Harvey et al. 2007; Cichon et al. 2007	++
Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like	<i>ARNTL/CLOCK</i>	Mansour et al. 2006 ; Nievergelt et al. 2006	+
Cadherin gene (homolog of the Drosophila tumor suppressor gene <i>fat</i>)	<i>FAT</i>	Blair et al. 2006 ; Abou Jamra et al. 2008	+

+++Association retrouvée dans une méta-analyse d'au moins trois études ;
 ++ association retrouvée dans plusieurs études indépendantes ;
 + association retrouvée dans deux études.

On voit ainsi que, malgré le nombre croissant d'études, l'association entre des gènes de vulnérabilité et le trouble bipolaire demeure complexe et les conclusions non évidentes. En effet, le manque de connaissances physiopathologiques conduit à une hétérogénéité clinique en psychiatrie qui peut expliquer ces résultats discordants, et/ou pose la question de la spécificité de ces découvertes. De plus, on peut s'interroger sur les conséquences pour un individu d'être porteur de ces différents allèles de vulnérabilité avec un risque augmenté si faible?

Ainsi, on se basera sur une hypothèse où c'est l'addition de plusieurs variants rares qui est à l'origine de cette maladie fréquente (Kendler 2013; Figure I. 10).

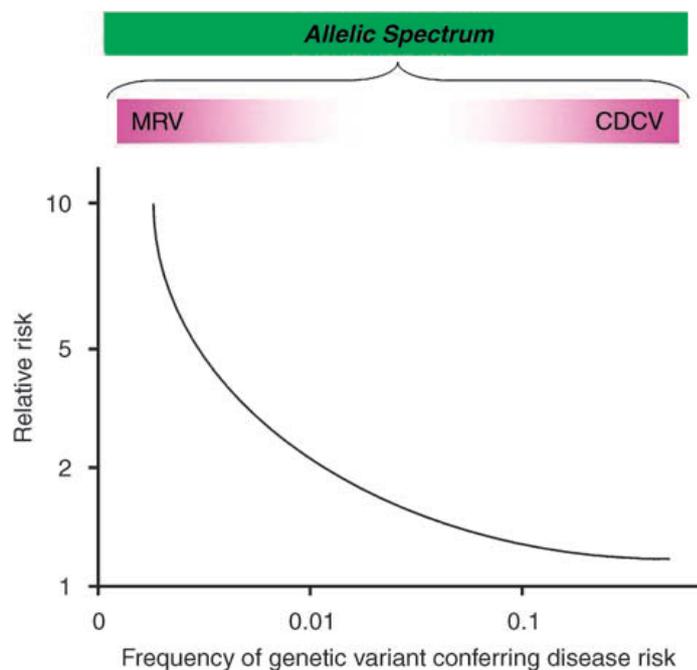


Figure I. 10. Représentation du risque relatif de développer une maladie psychiatrique en fonction de la variation allélique. (Psychiatric GWAS Consortium Steering Committee 2009)

Plusieurs variants génétiques rares (MRV pour *Multiple Rare Variants*) confèrent un risque dix fois plus élevé de développer une maladie psychiatrique, que des variants communs pour une maladie commune (CDCV pour *Common Disease/Common Variant*)

Les difficultés énoncées précédemment pour identifier des gènes de vulnérabilité aux troubles bipolaires et l'avancée des techniques de séquençage ont orienté les recherches en génétique vers des analyses sur l'ensemble du génome sans hypothèses *a priori*. L'idée est alors de comparer soit au sein de populations, les variations qui pourraient être plus fréquentes chez les patients avec un trouble bipolaire que dans une population contrôle (étude d'association), soit au sein de familles les régions les plus fréquemment partagées par les individus malades (analyse de liaison génétique) sur l'ensemble du génome.

3.2.2. Etude d'association génétique sur l'ensemble du génome.

Les progrès récents de génotypage à haut débit, dans lequel des centaines de milliers de polymorphismes répartis sur l'ensemble du génome peuvent être identifiés (Sachidanandam et al. 2001), a permis d'obtenir le séquençage complet du génome humain (E. S. Lander et al. 2001). De nouvelles approches d'associations pangénomiques appelées GWAS pour *Genome-Wide Association Studies* ont ainsi pu voir le jour. Contrairement à l'approche de gènes candidats, les GWAS ont la capacité de fournir des informations sur des polymorphismes d'un nucléotide (SNP for *Single Nucleotide Polymorphism*) répartis sur tout le génome, et d'en comparer leurs fréquences alléliques par rapport à une population de témoins.

Les premiers GWAS réalisés sur les troubles bipolaires depuis 2007, ont permis d'identifier peu d'associations génotypiques avec la maladie, du fait du seuil stringent de significativité à l'échelle du génome (Dudbridge 2008). Ces études demandent un grand nombre de sujets étudiés et doivent être répliquées sur des populations indépendantes (Lee et al. 2012). C'est pourquoi, en raison de ces contraintes statistiques, un consortium international appelé *Psychiatric GWAS Consortium* (PGC) s'est formé. Les données cumulées de 7 481 patients et 9 250 témoins, puis répliquées sur 4 496 patients et 42 422 témoins ont permis d'identifier 34 polymorphismes. De cette analyse, deux gènes sont ressortis comme étant associés au troubles bipolaires dans cette population: il s'agit de *CACNA1C* et *ODZ4* qui codent respectivement pour la sous-unité α d'un canal calcique voltage dépendant de type L et une protéine de surface qui pourrait jouer un rôle dans la neurogénèse (Group 2011). Cependant, pour ces deux gènes, le risque de développer un trouble bipolaire lorsqu'on est porteur de l'un de ces allèles n'est

augmenté que de 1,14 fois par rapport à la population générale, soit un effet très faible sur la prévalence des troubles bipolaires dans la population.

Une autre méta-analyse de GWAS regroupant les données de 5 études incluant 13 600 individus (dont le National Institute of Mental Health Bipolar Disorder (NIMH-BP), Genetic Association Information Network MDD (GAIN-MDD), Wellcome Trust Case Control Consortium (WTCC), Systematic Treatment Enhancement Program for BD (STEP-BD) et une cohorte allemande), a permis de mettre en évidence plusieurs SNP associés de manière significative ($p=3,63 \times 10^{-8}$; IC=0,83-0,92) aux maladies de l'humeur, dont un au niveau du bras long du chromosome 3, plus particulièrement dans la région 3p21.1 au niveau du gène *PBRM* (McMahon et al. 2010).

Par ailleurs, outre la puissance statistique contraignante, la nosographie psychiatrique est remise en question (Crow 1990). C'est pourquoi, dans une étude de GWAS réalisée sur la schizophrénie, les auteurs se sont intéressés à toutes les variations qui pourraient contribuer faiblement à l'établissement de la maladie. Ils ont ainsi pu calculer un score génétique global portant sur l'information de plusieurs milliers de variations. Ils ont montré que le score polygénique global était plus élevé chez des patients avec une schizophrénie que dans la population générale. De manière intéressante, ce même score était également plus élevé chez des patients avec un trouble bipolaire que chez des patients avec d'autres maladies non psychiatriques ou dans la population générale (International Schizophrenia Consortium et al. 2009; Nick Craddock, O'Donovan, and Owen 2006).

Ainsi, cette étude démontrait, d'une part l'hypothèse d'association de variant rares pour expliquer des maladies fréquentes (Figure I. 10), mais aussi le caractère polygénique des troubles bipolaires et de la schizophrénie (à l'image du continuum nosographique entre ces deux pathologies). En effet, une étude réalisée sur un ensemble de cinq maladies psychiatriques avec 33 332 cas et 27 888 contrôles, a retrouvé quatre régions chromosomiques précédemment identifiées comme associées aux troubles bipolaires (dont la région 3p21, la 10q24, et des SNP dans *CACNA1C* et *CACNB2*); mais aussi avec un risque polygénique partagé entre le trouble bipolaire et la schizophrénie le plus élevé (Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics Consortium 2013).

Enfin, dans le cadre des troubles bipolaires et par souci d'hétérogénéité génétique, l'étude de sous-groupes cliniquement plus homogènes, peut permettre une meilleure

identification de polymorphismes associés aux troubles. C'est pourquoi, dans une méta-analyse de GWAS réalisée sur des patients avec un trouble bipolaire, les auteurs ont analysé les données en fonction de l'âge de début de la maladie et de la survenue de symptômes psychotiques. Bien que ces deux critères soient corrélés, l'analyse différentielle n'a pas permis de détecter de SNP atteignant le seuil de significativité. Malgré tout, dans le cadre des symptômes psychotiques, plusieurs gènes dont un situé dans la région 3p14, sont proches du seuil de significativité (*FHIT*, $p=8,81 \times 10^{-6}$) (Belmonte Mahon et al. 2011).

Tableau I. 2. Etude de GWAS et méta analyse dans les troubles bipolaires.

Auteurs	Année	Population	Cas1	Témoins1	Significativité 5x10 ⁻⁸	Cas2	Témoins 2	Significativité 5x10 ⁻⁸	Gènes significatifs	Autres gènes impliqués
Baum †	2007	NIMH and Allemand	461	563	Non	772	876	Oui	<i>DGKH</i>	
WTCCC	2007	WTCCC	1868	2938	Non	–	–	NA		<i>KCNC2, GABRB1, GRM7, SYN3</i>
Ferreira	2008	STEP-BD & UK & Ireland	1098	1267	Non	4387	6209	Oui	<i>CACNA1C, ANK3</i>	
Sklar	2008	STEP-BD	1461	2008	Non	–	–	NA		<i>MYO5B</i>
Scott	2009	européens	2076	1676	Non	3683	14507	Non		<i>ITIH1 GNL3, NEK4, and ITIH3</i>
Smith	2009	européens et américains africains	1003	1033	Non	345	670	Non		<i>NAP5, DPY19L3, NTRK2</i>
Hattori	2009	Japonais	107	107	Non	395	409	Non		
Djurovic	2010	Norvégiens, Islandais	194	336	Non	435	10258			<i>DLEU2, GUCY1B2, PKIA, CCL2, DPP10, CNTNAP5, FBN1</i>
PGC-BD	2011	PGC-BD	7481	9250	Oui	11974	51792	Oui	<i>CACNA1C, ODZ4</i>	
Smith	2011	BiGS	2191	1434	Non	–	–	NA		
Yosifova	2011	Bulgares	188	376	Non	122	328	Non		<i>GRIK5, PARD6B, CTSH</i>
Cichon	2011	MooDS (Allemand)	682	1300	Non	8441	35362	Oui	<i>NCAN</i>	
Lee	2011	Chinois	1000	1000		409	1000	Non		<i>SP8, ST8SIA2, KCTD12, CACNB2</i>
Hamshere	2012	britannique	–	–	NA	2504	2878	Oui	<i>CACNA1C, ITIH3/4</i>	
Green	2012	britannique + PDG	1218	2913	Non	8699	12163	Oui	<i>CACNA1C, ODZ4</i>	<i>RHEBL1 and DHH TRPC4AP</i>
Chen	2013	méta-analyse	6658	8187		484	1823	Oui	<i>TRANK1</i>	<i>ANK3</i>
Muhleisen	2014	PGC-BD & MooDS	9747	14278	Oui	–	–	NA	<i>ANK3, ODZ4, TRANK1, ADCY2</i>	
Xu	2014	Canadiens et britannique	950	950	Non	–	–	NA		

NA=non applicable. L'étape 2 et les réplifications testent seulement les SNP les plus associés dans un large échantillon. †un génotypage avec ADN combinés seulement

En conclusion, les méta-analyses ont montré une surreprésentation de SNP dans les troubles bipolaires, permettant de répliquer les précédentes associations génétiques (Tableau I. 2). L'une d'elle a genotypé les 48 SNP les plus associés à la maladie, et 8 étaient retrouvés alors que le nombre attendu par chance n'était que de 2,4 (Cichon et al. 2011). Une autre étude montre un excès de représentation de SNP identiques dans deux populations de patients avec un trouble bipolaire (E. N. Smith et al. 2009) en comparaison avec d'autres maladies (Erin N. Smith et al. 2011). Il existe ainsi des SNP associés de manière plus fréquente à la maladie que le voudrait le hasard. Ces résultats vont premièrement dans le sens d'une composante génétique aux troubles bipolaires, deuxièmement d'une hétérogénéité génétique et troisièmement d'une polygénécité. Malgré tout, une étude montre que suivant l'origine ethnique, les SNP les plus associés à la maladie ne sont pas les mêmes entre les Africains et les Européens (Scott et al. 2009). Ceci suggère que la variation génétique qui contribue à la vulnérabilité du trouble diffère entre les différents groupes ancestraux. Ce manque de cohérence peut montrer une hétérogénéité génétique avec des événements mutationnels indépendants, ou souligner l'importance de l'environnement pour expliquer la diversité génétique.

3.3. Analyse de liaison sur génome entier

Les analyses de liaisons permettent de localiser des régions génétiques transmises préférentiellement chez des individus malades et qui pourraient ainsi contenir des gènes de vulnérabilité. Cette stratégie d'étude s'avère efficace pour les maladies mendéliennes, monogéniques et oligogéniques. Elle est donc pertinente pour tester l'hypothèse ou de multiples variations rares pourraient être impliquées dans la vulnérabilité aux troubles bipolaires.

De nombreuses études de liaison ont été réalisées dans les troubles bipolaires, mais la plupart des résultats n'ont pas été confirmés par des études ultérieures (Schulze and McMahon 2003). De plus, tous les chromosomes ainsi que plusieurs régions dans chaque chromosome ont été impliqués (Serretti and Mandelli 2008; Figure I. 11). Ainsi, les résultats rarement concordants rendent ces données peu convaincantes. Les problèmes associés à ces études peuvent s'expliquer par la taille limitée des échantillons, le mode de transmission et la pénétrance inconnue ou le statut clinique des patients.

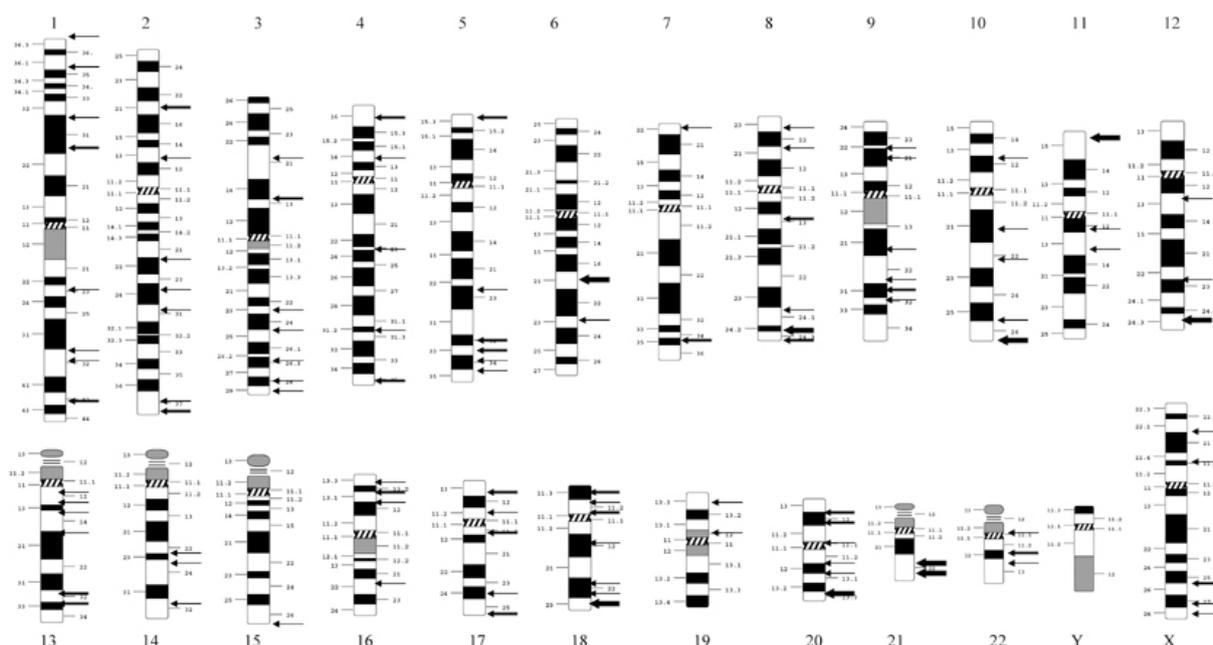


Figure I. 11. Régions du génome qui ont été liées aux troubles bipolaires (Serretti and Mendelli, 2008)

L'épaisseur des flèches est proportionnelle au degré de liaison avec la maladie.

Néanmoins, des études s'abstenant des paramètres de la maladie (non-paramétriques) ont permis de combiner plusieurs études ultérieures (méta-analyse) dans le but d'obtenir des résultats plus robustes. Cette méthode identifie les régions chromosomiques plus fréquemment partagées par des germains atteints que ne le voudrait le hasard, au moyen d'un calcul statistique de vraisemblance qu'est le lod score (E. Lander and Kruglyak 1995).

Parmi elles, une étude de liaison réalisée sur 23 familles finlandaises avec des troubles bipolaires de type I, II ou non spécifiés a permis de mettre en évidence une liaison génétique entre la maladie et les régions chromosomiques 7q31 et 9p13.1. Dans la région télomérique 7q31 un des gènes candidats pourrait être *CADPS2* (Palo et al. 2010). De plus, une autre étude réalisée sur 36 familles avec un trouble bipolaire et répondeur au lithium, met en évidence une liaison génétique avec les régions 3p25, 3p14 et 14q11. Dans la région 3p14, une étude d'expression réalisée sur différentes aires de cerveaux en post-mortem révèle que le gène *CADPS* est surexprimé chez des patients bipolaires comparé à des témoins (de Lara et al. 2010).

Une première méta-analyse qui regroupait 14 études avec 1733 patients issus de 559 familles, ne parvient pas à atteindre le seuil de liaison génétique à l'échelle du génome

mais des corrélations modestes entre la maladie et les régions 9p22.3-p21.1, 10q11.21-22.1, 14q24.1-32.12 (Segurado et al. 2003). Une seconde méta-analyse incluant 18 études avec 5179 patients issus de 1067 familles, parvient à atteindre le seuil de significativité sur l'ensemble du génome pour les régions 6q21-q25 et 8q24, mais sans répliquer les régions déjà identifiées (McQueen et al. 2005). Enfin, la plus grande analyse de liaison coordonnée par une collaboration internationale sur 972 familles multiplexes, n'a pas permis d'identifier clairement une nouvelle région, ni de répliquer les résultats précédents (Badner et al. 2012). Ces résultats discordants, témoignent de la complexité génétique de cette pathologie. Ils révèlent encore une fois, l'hétérogénéité clinique de la pathologie et nous aiguillent sur le besoin de s'accorder sur les phénotypes étudiés. Ainsi, en se basant sur des sous-groupes plus homogènes cliniquement et génétiquement (M. Leboyer et al. 1998), notre équipe a réalisé une étude de liaison sur l'ensemble du génome dans des familles de sujets avec une forme à début précoce de troubles bipolaires. Nous avons pu identifier que la région 3p14 était significativement liée aux formes à début précoce de troubles bipolaires (B. Etain et al. 2006). Dans la région 3p14, se situe un gène codant un protéine activatrice de l'exocytose dépendante du calcium : CADPS (pour *Calcium Activator Dependant Protein for Secretion*) (Figure I. 12).

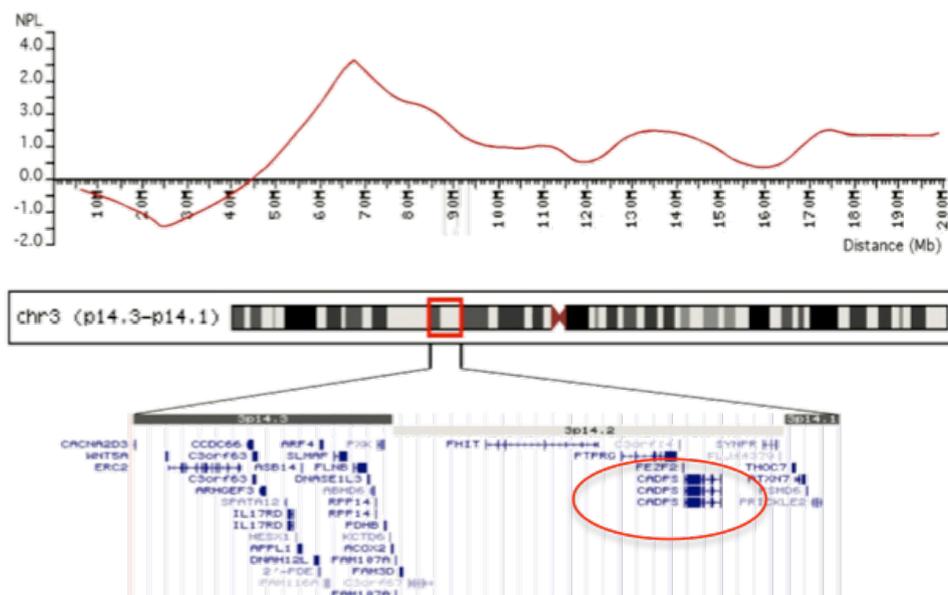


Figure I. 12. Graphique de l'analyse non paramétrique multipoints de liaison entre le chromosome 3 et le TBP. (B. Etain et al. 2006)
En dessous est représentée la position génomique du gène *CADPS* (NCBI)

Par la suite, dans notre laboratoire, nous avons ainsi séquencé l'ADN de 132 patients avec un TBDP et 184 témoins sains, pour les séquences codantes du gène *CADPS*, ainsi que son promoteur et les parties 5' et 3'UTR. Nous avons pu identifier 6 mutations non synonymes, une délétion, ainsi qu'une double mutation chez 4,5% des patients pour une prévalence retrouvée chez 1,63% des contrôles, suggérant son implication dans la vulnérabilité aux TB (Nicolas 2011; Figure I. 13).

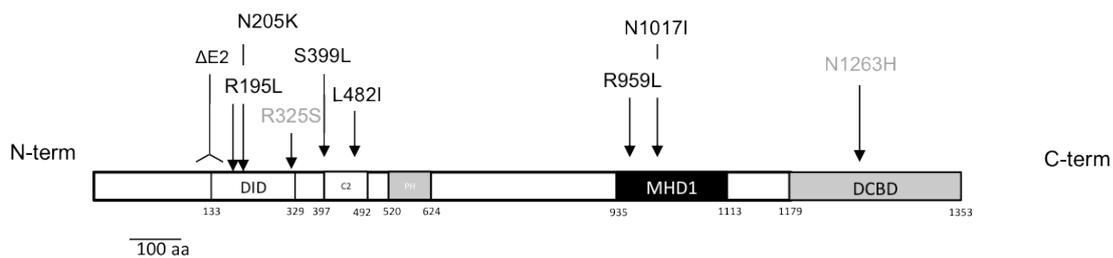


Figure I. 13. Position des mutations non-synonymes trouvées dans le gène *CADPS* chez des patients avec un trouble bipolaire à début précoce.

La protéine CADPS mesure 152,6 kDa. Elle possède 5 domaines protéiques spécifiques, qui sont le *Dynein Interacting Domain* (DID), le *C2 domain* (C2), le *Pleckstrin Homology domain* (PH) le *Munc Homology Domain* (MHD) et le *Dense-Core vesicle Binding Domain* (DCDV). Ici est représentée la position des 6 acides aminés affectés par les mutations identifiées chez les patients avec un TBDP (en noir), et chez les témoins (en gris).

Mon travail de thèse ainsi s'est focalisé sur le gène *CADPS*, dans une hypothèse *a priori* mécanistique, suivant cette précédente analyse de liaison, puis ce séquençage. A l'image de *SNAP25*, peu de gènes dans cette région sont exprimés dans le cerveau et ont une fonction directement liée à la régulation de l'humeur. Durant ma thèse, j'ai donc essayé de démontrer que ce gène pouvait être un bon candidat pour expliquer la physiopathologie des formes à début précoce de troubles bipolaires.

Pour cela, je vais tenter avant cela de présenter les mécanismes physiologiques qui font intervenir ce gène, dont l'exocytose synaptique calcium dépendante des neurotransmetteurs.

1. Le gène Calcium dependant activator protein for secretion candidat

4.1. Exocytose de neurotransmetteurs

L'exocytose de neurotransmetteurs, peptides ou hormones est un mécanisme crucial dans la communication cellulaire. Ainsi pour les cellules neuronales ce mécanisme de signalisation est ubiquitaire et s'établit de manière coordonnée, selon un schéma qui doit être précisément régulé pour que la réponse qui en résulte soit spécifique et d'intensité variable. Cette adaptation cellulaire, prévoit la présence de deux cellules dont une cellule transmet le signal alors que l'autre le reçoit (au lieu d'une seule) ce qui permet une régulation. Ceci implique alors une zone extracellulaire où les échanges s'opèrent : la synapse.

La diversité neuronale peut classiquement être classifiée en fonction du neurotransmetteur que le neurone produit et/ou du récepteur qu'il possède. La réception d'un signal pour ces cellules excitables (grâce à des canaux ioniques voltage-dépendants) que sont les neurones peut se traduire par un changement de potentiel membranaire *via* des récepteurs membranaires perméables aux ions (potentiel post-synaptique). C'est ce changement de potentiel qui est à l'origine de la cascade de réponses physiologiques. Ainsi, les neurotransmetteurs sont des médiateurs rapides ou lents de la transmission *via* des récepteurs ionotropiques/ métabotropiques pour le changement du potentiel membranaire.

De fait, un certain nombre de maladies psychiatriques ont été associées à des défauts de réception du signal pré-synaptique. Par exemple, dans la schizophrénie, l'observation en 1950 que la chlorpromazine (CPZ) pouvait réduire les symptômes positifs des patients a suggéré que c'était son action antagoniste sur les récepteurs dopaminergiques qui lui confèrait sa propriété antipsychotique (Laborit, Huguenard, and Alluaume 1952). De nos jours ce sont toujours des antagonistes dopaminergiques plus spécifiques (que l'on a pu corréliser avec leur liaison aux récepteurs D2) comme l'halopéridol qui sont utilisés comme neuroleptiques pour réduire les symptômes positifs de la maladie.

Les potentiels post synaptiques peuvent être de deux natures : le potentiel excitateur (PPSE) et le potentiel inhibiteur (PPSI). Dans notre étude, on s'intéressera à la partie excitatrice de la réponse cellulaire, qui est gouvernée principalement par un

neurotransmetteur, le glutamate ; mais aussi par des neuromodulateurs comme la sérotonine ou la dopamine.

Si la réception du signal est la conséquence de la réponse physiologique; la production, l'acheminement et la libération des neurotransmetteurs en est l'essence. Tous ces mécanismes pré-synaptiques sont aussi soumis à une régulation fine pour produire une réponse adaptée.

Les neurotransmetteurs synthétisés ou recyclés doivent être *empaquetés* dans des vésicules pour être libérés à la synapse. Ainsi on décrit des petites vésicules (<60nm), les small synaptic vesicles (SSV) contenant les neurotransmetteurs non peptidiques et les vésicules à cœur dense ou *large dense core vesicles* (LDCV ; de 120 à 200 nm) contenant les catécholamines ou les neurotransmetteurs peptidiques.

Les vésicules synaptiques sont initialement attachées à des protéines du cytosquelette et doivent être *recrutées* pour permettre leur libération. Par la suite, celles-ci doivent être solidement *arrimées* à la membrane présynaptique, l'exocytose des vésicules est ensuite *amorcée* de manière ATP dépendante, puis *fusionnées* à la membrane pré-synaptique pour libérer leur contenu en neurotransmetteurs. Enfin, une fois fusionnées à la membrane, les vésicules sont recyclées par un mécanisme actif d'*endocytose* permettant de ré-utiliser l'excédant membranaire (Südhof 2004; Figure I. 14).

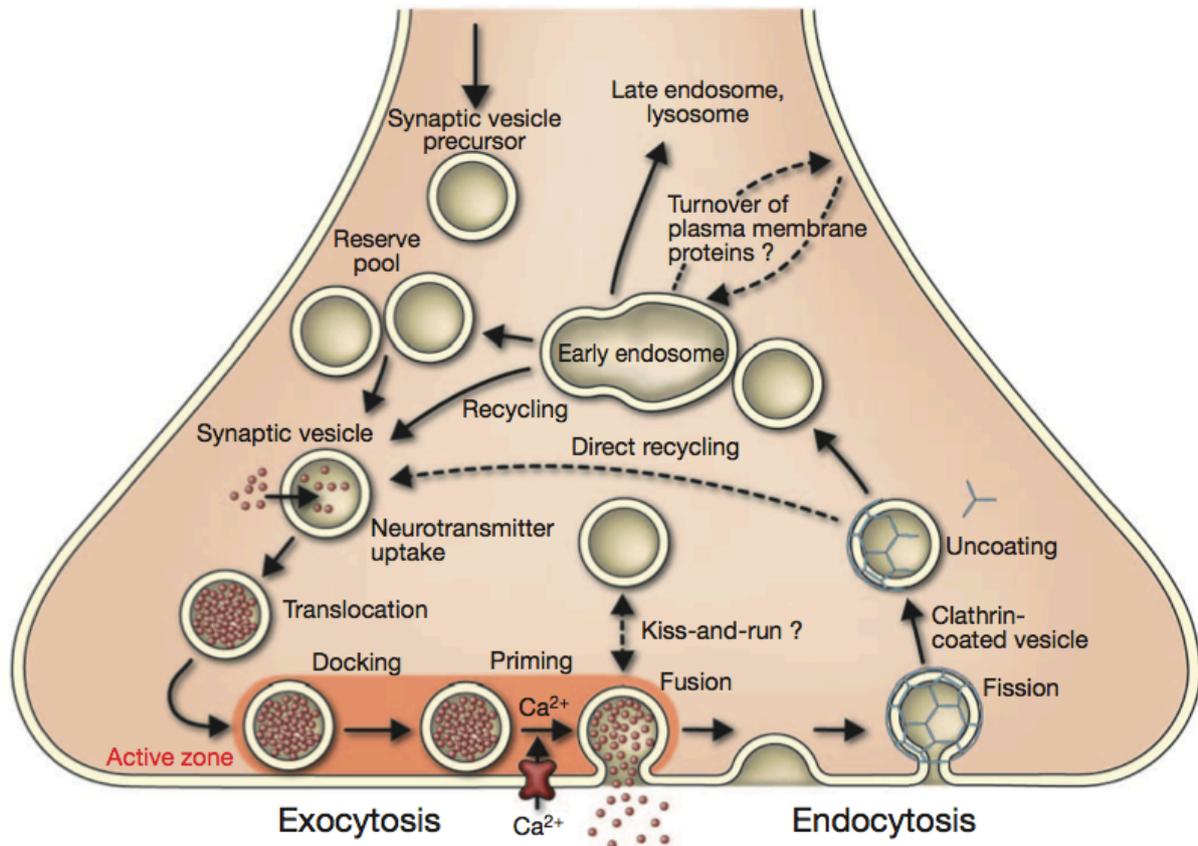


Figure I. 14. Trafic vésiculaire de neurotransmetteurs dans une terminaison nerveuse (Jahn and Fasshauer 2012).

L'ensemble des étapes clés qui conduisent à la libération de neurotransmetteurs est sensiblement identique quelque soit la synapse étudiée, montrant ainsi l'importance de ce mécanisme pour la communication intercellulaire. De fait, des modèles comme la jonction neuromusculaire, la synapse géante de calamar, les cellules chromaffines de la médullosurrénale, les synaptosomes ou les tranches de cerveaux sont des outils de référence pour l'étude de ce mécanisme. L'importance de ce mécanisme conservé doit ainsi être soumise à une régulation fine grâce, d'une part, à l'implication de protéines spécifiques et d'autre part, grâce à des molécules permettant le transport actif des neurotransmetteurs.

De nombreuses étapes dans la libération de neurotransmetteurs sont calcium-dépendantes. Dans le système nerveux central, le calcium extérieur entre dans les terminaisons nerveuses par plusieurs types de canaux voltage-dépendants. Toute manipulation qui vise à diminuer le niveau de calcium (élimination ou injection d'un

chélateur dans la terminaison) provoque une réduction de la libération de transmetteurs chimiques. De plus, on observe qu'après l'ouverture des canaux calciques voltage dépendants, la libération des neurotransmetteurs se fait de manière très rapide (quelques centaines de microsecondes) et que le retour à l'état basal est aussi corrélé à la concentration intracellulaire en calcium (Wojcik and Brose 2007; Südhof 2013).

Les vésicules sont rechargées par des transporteurs spécifiques à la surface vésiculaire qui utilisent le gradient de proton ou la différence de pH pour transporter les différents neurotransmetteurs à l'intérieur de la vésicule. En effet, il a été montré qu'un certain nombre de mutants du nématode *Caenorhabditis elegans* avaient des mouvements non coordonnés alors qu'ils produisaient de l'acétylcholine. Un des gènes impliqués : *unc-17* code une protéine à forte homologie avec les transporteurs monoaminergiques et celle-ci interagit avec une protéine vésiculaire : la synaptobrevine (Sandoval et al. 2006). L'expression de ce gène cloné dans une lignée cellulaire a permis de démontrer fonctionnellement qu'il s'agit bien du transporteur de l'acétylcholine :VAcHT (A. Alfonso et al. 1993). Des analyses d'homologie de séquences ont montré une structure similaire à environ 40% entre les transporteurs de l'acétylcholine et ceux pour les monoamines : VMAT1 et VMAT2 (Roghani et al. 1994).

La synapsine participe au recrutement des vésicules. Elle représente 9% de l'ensemble des protéines vésiculaires, et est liée à des protéines du cytosquelette telles que l'actine ou la fodrine. Cette liaison est rompue quand la synapsine est phosphorylée par la calmoduline-kinase. Ainsi, le déplacement des vésicules s'opère quand leur liaison avec les protéines du cytosquelette est réduite suite à leur phosphorylation (Schulman and Greengard 1978).

Un groupe de protéines comme Munc18 et certaines Rab participent à l'arrimage spatial des vésicules au niveau de la zone active. Par la suite, la fusion vésiculaire est amorcée par l'intermédiaire de protéines cytoplasmiques tel que les *Soluble NSF Attachment Proteins* (SNAP) (Wilson et al. 1989) qui se lient aux Snares pour former un complexe 20S (notion biochimique faisant référence à la taille du complexe) (Söllner et al. 1993). Cette hypothèse où le complexe *trans*-SNARE permet le rapprochement de la vésicule à la

membrane plasmique de manière spécifique, s'avère confirmer les résultats fonctionnels précédemment obtenus sur des mutants de *C.elegans* (Brenner 1974).

Les SNARE ont été identifiées comme étant des protéines vésiculaires regroupant la synaptobrevine (VAMP) et deux protéines de la membrane plasmique, la syntaxine et SNAP-25. Le rôle essentiel de ces trois protéines dans la fusion vésiculaire a été démontré suite à l'application de neurotoxines extraites de clostridies, bacilles botulique ou tétanique qui les clivent spécifiquement, et inhibent l'exocytose de neurotransmetteurs (Link et al. 1992; Juan Blasi et al. 1993; J Blasi et al. 1993). La disponibilité de la synaptobrevine pour interagir avec les t-SNAREs est modulée entre autre par son interaction avec la synaptophysine au niveau de la membrane vésiculaire; alors que la Munc-18 régule l'accessibilité de la syntaxine aux autres protéines SNAREs et peut interagir avec le complexe SNARE assemblé (Dulubova et al. 1999, Jahn and Fasshauer 2012). Après l'arrimage des vésicules, la synaptobrevine et la syntaxine se dissocient respectivement de la synaptophysine et de Munc-18 pour former un complexe avec la SNAP-25. Ceci laisse à penser que Munc-18 permet la régulation de la formation du complexe d'exocytose seulement dans les zones actives, en inhibant la liaison de la syntaxin-1 aux deux autres protéines pour éviter la formation du complexe SNARE (Wu et al. 2001).

La fusion de la vésicule à la membrane commencerait par une étape d'hémifusion d'un feuillet vésiculaire et d'un feuillet plasmique. Cette hémifusion serait stabilisée par la rigidité des assemblages protéiques qui entourent le pore de fusion. L'entrée calcique provoque un changement de conformation de la synaptotagmine (sensor calcique de l'exocytose) qui, en s'associant au complexe SNARE et aux lipides membranaires entraîne la fusion. Le cycle de fusion vésiculaire qui met en jeu l'assemblage et le désassemblage du complexe SNARE, s'opère ainsi par l'intermédiaire de l'enzyme NSF et des SNAP, qui permettent aux protéines du complexe d'être réutilisées lors d'un prochain cycle de fusion (Figure I. 15).

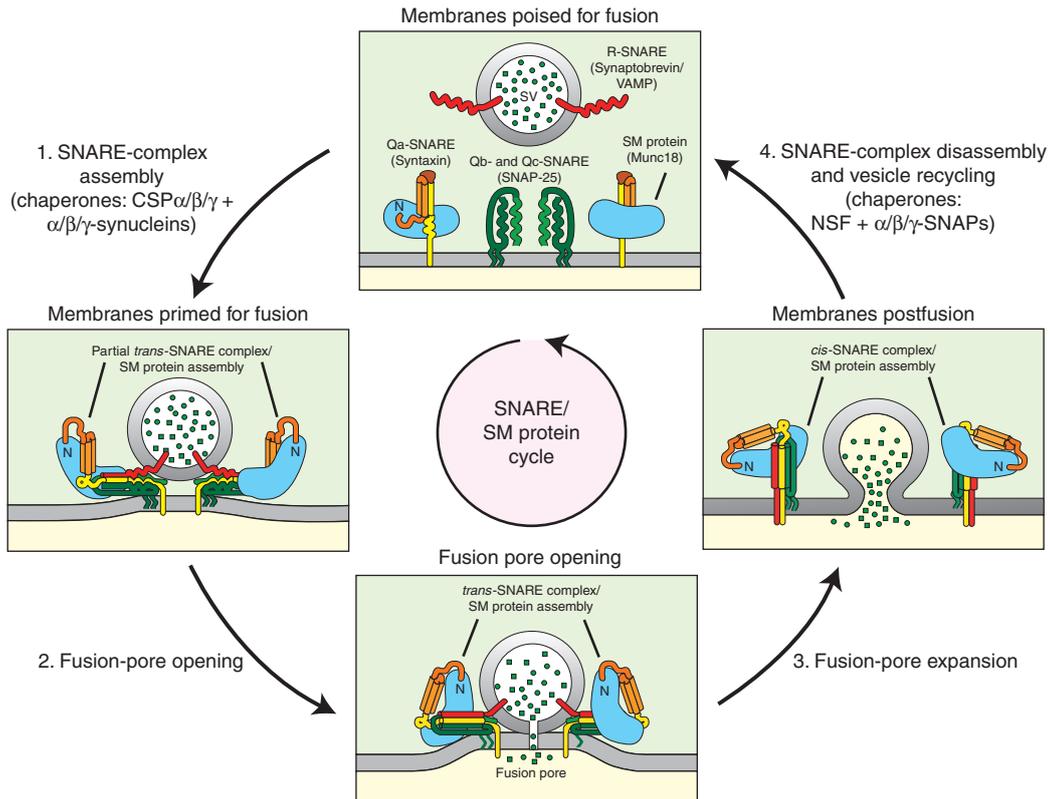


Figure I. 15. Le schéma moléculaire de la fusion des vésicules synaptiques (Sudhof T and Rizo J, 2011)

La Synaptophysine est une protéine énigmatique marqueur des vésicules synaptiques et de fonction encore inconnue. Ancien candidat à la formation de pore de fusion, elle possède quatre segments transmembranaires et s'apparente aux protéines formant les jonctions lacunaires. De plus, des enregistrements unitaires après reconstitution des bicouches lipidique ont démontré que cette protéine pourrait former une conductance ionique sensible au voltage.

*La protéine Munc13 participe à l'amorçage de la libération de neurotransmetteurs. Comme pour des mutants de *unc18*, les nématodes dérivés de graves problèmes locomoteurs et les souris déléetées pour ce gène ne parviennent plus à libérer du glutamate de manière évoquée ou spontanée (Augustin et al. 1999, Varoqueaux et al. 2002). Le nombre de vésicules prêtes à être libérées est fortement réduit chez des souris déléetées pour le gène *Munc13* (Weimer et al. 2006). Cette protéine est composée d'un domaine MUN, d'un domaine C1 et de deux domaines C2. L'expression seule du domaine*

MUN permet partiellement de restaurer les phénotypes décrits précédemment (Basu et al. 2005). D'autres protéines comme BAP3 ou CADPS possèdent un domaine MUN.

Dans le schéma de la fusion vésiculaire, Munc13 pourrait participer au déverrouillage de la liaison de la syntaxine1 avec Munc18 pour la formation du complexe SNARE (Ma et al. 2011).

La Synaptotagmine est le détecteur du calcium. En effet, cette protéine vésiculaire possède un domaine transmembranaire en N-terminal ainsi qu'un vaste domaine cytoplasmique avec deux domaines C2 lui permettant d'interagir avec le calcium et les phospholipides. Elle lie ainsi le calcium selon un modèle phospholipide-dépendant, car le blocage de cette protéine à sa cible (le calcium) inhibe totalement la libération des neurotransmetteurs et provoque une accumulation des vésicules à la zone active (Vrljic et al. 2010). Malgré tout, d'un point de vue plus spécifique, les études électrophysiologiques sur des souris mutantes pour la synaptotagmine ont permis de montrer que la libération de neurotransmetteurs dépendante du calcium avait deux composantes cinétiques distinctes : l'une est rapide et explique 80% de la libération de manière synchronisée avec la stimulation, alors que l'autre est lente. La composante rapide est corrélée avec une affinité faible du calcium alors que la lente demande une forte affinité au calcium. Chez les mutants pour la synaptotagmine la composante lente demeure inchangée. Ainsi, ce mécanisme de régulation synchrone d'entrée du calcium au niveau pré-synaptique reste incomplet et prévoit alors l'intervention d'autres protéines qui participeraient à la finesse de ce mécanisme. D'autres protéines sensibles au calcium participent-elles au mécanisme de libération de neurotransmetteurs ? (Miller et al. 1996 ; Hay et al. 1995; Hay and Martin 1993)

4.2. Calcium Activator Dependant Protein for Secretion

Une protéine cytosolique qui catalyse le phosphoinositol 4-5 bisphosphate et senseur du calcium, a été identifiée dans la zone active des cellules excitables et se lie au calcium avec une affinité plutôt faible ($K_d=270\mu\text{M}$). Cette protéine (CADPS pour *Calcium-dependant activator protein for secretion*) a été purifiée à partir du cytoplasme de cerveaux de rat. De manière intéressante, la séquence d'ADN complémentaire de ce gène de rat a permis de montrer qu'il s'agit de l'homologue de *unc-31* chez *C. elegans*,

intervenant dans le mécanisme de neurosécrétion (75% de similarité et 54% d'identité) (Avery, Bargmann, and Horvitz 1993; K. G. Miller et al. 1996).

4.2.1. Clonage de CADPS humain.

Chez l'Homme, le gène *CADPS* couvre 475kb sur le bras court du chromosome 3 en position 3p21.1 selon le HGNC (*HUGO Gene Nomenclature Committee*) ou 3p14.2 selon *Ensembl*, et contient 30 exons (Cisternas et al. 2003). La séquence de l'ADN complémentaire de *CADPS* a permis d'en déduire la séquence protéique, qui contient 1289 acides aminés pour un poids moléculaire de 145kDa. Chez le rat, la détection de la protéine dans le cytosol grâce à différents anticorps dirigés contre différentes régions de la protéine a permis de mettre en évidence la présence de plusieurs isoformes pour *CADPS* variant au niveau de la partie C-terminal. Les études d'expression à partir des ARNm de *CADPS* ont montré par Northern blot, une détection d'un transcrite de 5,6kb dans différentes régions du cerveau de rat (hypothalamus, hypophyse), du pancréas, de la glande médullosurrénale ; mais pas au niveau du cœur, du placenta, des poumons, du foie, des muscles squelettiques ou des reins. En résumé, l'expression de cette protéine corrobore avec son implication fonctionnelle pour la sécrétion endocrine (Ann et al. 1997).

La séquence protéique de *CADPS* est majoritairement hydrophile, excepté les domaines de liaison membranaire ; ainsi que deux régions (résidus 94-129 et 869-898) qui peuvent potentiellement former des domaines en superhélice, ce qui permettrait sa dimérisation ou sa liaison avec d'autres protéines.

De plus, des études de dialyse de la protéine recombinante confirment la présence de deux sites de liaisons différentiels au calcium : Un site d'affinité forte ($K_d=270\mu\text{M}$) correspondant à 2 moles de calcium lié par mole de *CADPS*, et un site de faible affinité ($K_d=4.3\text{mM}$) correspondant à 10 moles de calcium lié pour une mole de *CADPS*. Cette liaison au calcium représenterait la moitié du calcium nécessaire pour déclencher l'exocytose (Ann et al. 1997).

4.2.2. CADPS est une protéine essentielle à l'amorçage de l'exocytose.

La structure protéique de *CADPS* révèle au moins trois domaines connus dont un domaine d'homologie aux *Pleckstrins* (PH domaine) qui se lie aux phospholipides

membranaires, un domaine d'homologie à la famille des Munc (MHD pour *Munc Homology Domain*), un domaine de liaison au LDCV en C-terminal et un domaine de liaison au calcium (C2 domaine) (Grishanin et al. 2002). Cette structure protéique est à mettre en parallèle avec ses multiples fonctions dans le mécanisme d'exocytose où, encore aujourd'hui, sa place essentielle ou redondante dans le schéma de la régulation de l'exocytose est débattue.

Pour autant, cette grosse protéine est un facteur nécessaire et suffisant pour l'exocytose de neurotransmetteurs. En effet, dans des lignées tumorales de cellules chromaffines de la médullosurrénale de rat (PC12 : *pheochromocytoma-12*), la présence de la protéine purifiée CADPS est suffisante à remplacer tout le cytosol extrait du cerveau de rat pour la libération de norépinéphrine (NE) dépendante du calcium. Aussi, la présence du cytosol sans ajout de CADPS permet une exocytose réduite, mais le blocage de son action grâce à un anticorps dirigé contre elle annihile toute exocytose de NE (Walent, Porter, and Martin 1992; Hay and Martin 1993; Ann et al. 1997). De plus, les manipulations génétiques sur des organismes tels que *C. elegans* ou chez la drosophile ont aussi confirmé l'importance de ce gène dans la sécrétion de glutamate ou d'acétylcholine. En effet, la délétion de ce gène réduit de 50% la transmission synaptique, sans que sa réexpression dans des neurones moteurs puisse sauver le phénotype (Renden et al. 2001). Encore une fois, les résultats bien que divergents confirment la fonction de CADPS comme participant au mécanisme d'exocytose, mais sa nécessité (ou sa redondance) ainsi que sa place dans le mécanisme de libération de neurotransmetteurs reste incertaine.

Il a été rapporté que quelques protéines comme CADPS interviennent spécifiquement dans l'exocytose des LDCV et pas des SSV (Walent, Porter, and Martin 1992; Hay and Martin 1993; Ann et al. 1997; Berwin, Floor, and Martin 1998; Tandon et al. 1998). Malgré tout, des études infirment cette fonction exclusive pour la libération des LDCV, comme nous allons le voir par la suite.

Chez la souris, les manipulations génétiques dans des cellules embryonnaires ont permis par recombinaison homologue de générer des souris hétérozygotes et homozygotes délétées pour le gène *Caps1* (homologue murin de *CADPS*). Malgré tout, les nouveaux-nés privés totalement de CAPS1 décrivent des anomalies respiratoires et se déplacent seulement après stimulation tactile. Au bout de 10 à 30min, ces souris meurent sans avoir de problèmes anatomiques, histologiques ou protéique détectables. Ainsi, on peut

conclure que CAPS1 n'intervient pas dans le développement de l'animal, mais que sa présence est nécessaire à la vie adulte sans pour autant en comprendre les causes (Speidel et al. 2005).

La létalité de la souris homozygote (CAPS-1 KO) à l'état adulte, n'enlève en rien l'étude possible de ce modèle sur des neurones à l'état embryonnaire (E19). Ainsi, les études électrophysiologiques sur des cultures de neurones autaptiques d'hippocampes de souris délétées pour CAPS-1 et CAPS-2 (double knock-out, CAPS DKO) ont montré que l'amplitude des courants excitateurs post- synaptiques évoqués par stimulation (EPSC= Evoked post-synaptic current) étaient réduits de 51% comparé à des souris sauvages alors que 12% des souris étudiées ne décrivaient même pas de EPSC (Jockusch et al. 2007). D'un point de vue morphologique, cette observation est corrélée avec une diminution drastique du groupe de vésicules prêtes à être exocytées à la synapse (RRP= ready releasable pool) de plus de 42%. Cette diminution n'est pas à associer à une structure synaptique modifiée, car le nombre total de synapses, ou le RRP estimé après un choc osmotique provoqué par une solution de sucrose, n'est pas modifié. Ainsi, on peut penser que la modification dans la libération de glutamate est due à des défauts pré-synaptiques. Les neurones, ici étudiés, libèrent du glutamate dans des vésicules synaptiques et ne contiennent pas ou peu de LDCV, ainsi on peut ajouter que CAPS-1 est un élément essentiel pour l'amorçage de l'exocytose des vésicules synaptiques (SV) (Jockusch et al. 2007).

4.2.3. La fonction de CADPS n'est pas redondante avec la protéine Munc13.

Ces défauts sévères dans cette étape clé du mécanisme d'exocytose est similaire à celui observé chez des souris privées de la protéine Munc-13. (Augustin et al. 1999; Rosenmund et al. 2002). On pourrait dès lors penser que l'une des deux protéines n'est pas essentielle dans ce mécanisme. Or les expériences de sauvetage phénotypique par surexpression de CAPS-1 dans des souris Munc13-1/2 DKO ne permet pas de restaurer l'absence de l'EPSC (Jockusch et al. 2007). Inversement, chez les souris CAPS-1 KO, la protéine Munc13 est correctement présente et localisée et sa surexpression ne permet pas le sauvetage phénotypique.

Une des pistes pour évoquer la nécessité contestée de CADPS dans le mécanisme d'exocytose est d'en démontrer son action associée et complémentaire de Munc13. Essayons alors de déduire un modèle d'action conjoint de ces deux protéines pour l'amorçage de l'exocytose.

CADPS est localisée au niveau des vésicules, et sa structure protéique diffère de Munc13 en la présence d'un domaine PH pour CADPS qui, muté, inhibe sa liaison au phosphoinositol (PIP2) et ne permet pas de rétablir une fusion vésiculaire normale dans des conditions de stimulation modérée (60mM KCl). Ainsi, on peut dire que la protéine vésiculaire CADPS a besoin d'interagir en *trans* avec le PIP2 membranaire pour déclencher l'exocytose modérée de neurotransmetteurs (Kabachinski et al. 2014). De plus, contrairement à Munc13, le domaine MUN de CADPS n'est pas essentiel à l'amorçage de l'exocytose des vésicules synaptiques (Nguyen Truong et al. 2014). Ces résultats renforcent l'hypothèse que CADPS et Munc13 agissent de manière distincte dans ce mécanisme d'exocytose : par l'intermédiaire de son interaction phospholipidique grâce au domaine PH pour CADPS, et par l'intermédiaire de son interaction avec la syntaxine grâce à son domaine MUN pour Munc13.

Munc13 est localisée de manière diffuse dans le cytosol, mais la stimulation du mécanisme engendre son confinement, sa translocation à la membrane plasmique *via* son domaine C2B (Kabachinski et al. 2014). Après une forte stimulation (95mM KCl), le PIP2 n'intervient que de manière indirecte en tant que précurseur de la formation de diacylglycerol (DAG). Ainsi, dans cette configuration, CADPS n'a plus d'impact pour la fusion vésiculaire tandis que Munc13 reste indispensable dans des conditions modérées ou fortes.

4.2.4. Hypothèse mécanistique

Les études phénotypiques sur des cellules chromaffines provenant d'embryons de souris homozygotes pour le gène *Caps1* n'ont montré aucune différence de sécrétion après stimulation. Malgré tout, les études ampérométriques révèlent que seulement 40% des LDCV étaient remplies en catécholamines, sans que cela soit dû à un problème développemental (Speidel et al. 2005).

En parallèle, les études phénotypiques sur des cellules chromaffines de souris adultes hétérozygotes pour le gène *Caps1*^{+/-} ont montré, que le groupe de vésicules prêt à être libéré (RRP) et la capacitance membranaire était significativement diminués ; alors que l'amplitude des courants au niveau des canaux voltage dépendants, ou la cinétique de fusion des vésicules n'était pas modifiée.

Ainsi, les résultats contradictoires laissent à penser que CAPS1 intervient dans la régulation du nombre de LDCV ou en amont du mécanisme de fusion vésiculaire, pour la biogenèse, le chargement ou le transport des vésicules synaptiques. Une des explications pour comprendre cette différence serait que, chez la souris adulte les mécanismes de contrôle permettraient d'éliminer les granules vides de catécholamines, alors qu'il ne seraient pas opérants à l'état embryonnaire (Südhof 2005).

En effet, le nombre de vésicules LDCV proche de la membrane plasmique, chez les souris hétérozygotes est fortement réduit alors qu'il ne l'est pas pour les homozygotes à l'état embryonnaire. On peut dès lors exclure un problème de biogenèse des vésicules ou de transport vésiculaire. Ainsi, la seule explication plausible pour comprendre ces différences serait que les vésicules fusionnées à la membrane ne contiennent pas de catécholamines. Le dosage des différentes catécholamines et de leurs métabolites (catéchols) a permis de montrer que le niveau de dopamine était réduit chez les souris homozygotes avec un taux de catéchols cytoplasmique fortement augmenté, confirmant un rôle de CAPS1 dans le chargement et/ou le confinement, la stabilité des neurotransmetteurs.

4.2.5. CADPS intervient dans le chargement vésiculaire de monoamines.

Le rôle de CAPS1 dans la médiation du chargement vésiculaire en neurotransmetteurs a dès lors été investigué à l'aide de préparations vésiculaires issues de souris délétées pour *Caps1* ou hétérozygotes. Les résultats confirment l'hypothèse de *Spiedel et al., 2005*, car les souris privées de *Caps1* diminuent de manière significative leur chargement en sérotonine, et ceci sans que le transporteur ou la pompe à protons contenus dans ces vésicules ne soient altérés. De plus, il est possible de reproduire cette observation sur des souris sauvages chez qui l'on bloque l'activité de CAPS1, à l'aide d'un anticorps dirigé contre elle, on observe cette même diminution.

Pour confirmer de manière directe son implication dans le chargement vésiculaire, des cellules d'ovaires de hamster chinois (CHO for Chinese hamster ovary) exprimant de manière constitutive le transporteur vésiculaire des monoamines (VMAT1 et 2) ont été transfectées avec le gène codant la protéine CAPS-1. Encore une fois, les résultats démontrent que cette protéine promeut le chargement vésiculaire en sérotonine *via* son transporteur vésiculaire (Brunk et al. 2009).

Ces résultats controversés (Fujita et al. 2007) qui placent la protéine CADPS comme un acteur majeur dans deux fonctions essentielles du processus d'exocytose (à savoir le chargement et l'amorçage de l'exocytose) reste toujours à éclaircir. Tout d'abord, on peut se demander si une même protéine peut intervenir dans deux processus séparés dans le temps? Si oui, alors quel est son mode d'action dans la chronologie du mécanisme? Enfin, de manière plus globale quelle est son importance, son impact dans le mécanisme, au vu de sa faible représentation dans le schéma de l'exocytose?

Toutes ces réponses peuvent être apportées en se plaçant dans le cadre du pathologique, où la fonction et l'importance de cette protéine pourront dès-lors être concrètement discutées.

4.2.6. CADPS permet la transition du complexe SNARE.

Pour l'heure, d'autres arguments biochimiques renforcent la thèse d'une importance de CADPS dans le mécanisme de l'exocytose. La fusion des vésicules à la membrane plasmique est médiée par la formation en *trans* du complexe SNARE qui permet l'apposition des membranes vésiculaires et plasmiques (Weber et al. 1998).

L'assemblage du complexe *trans* SNARE est catalysé par des protéines accessoires qui se lient au complexe (Shorter et al. 2002). Parmi ces protéines, Sec-1/Munc18 agissent de concert avec d'autres protéines accessoires. Il a été montré que CADPS accélère la fusion SNARE-dépendante de liposomes *in vitro* (D. J. James et al. 2008), mais aussi la formation du *trans* complexe (D. J. James et al. 2009, Figure I. 16).

Pour en expliquer le mécanisme d'action, une réponse vient du fait que CADPS a la propriété de se lier indépendamment à chacune des protéines du complexe SNARE, indispensable à la fusion des vésicules (Daily et al. 2010). Plus précisément, dans des liposomes contenant les différentes protéines du complexe, l'incubation avec la protéine recombinante CADPS a montré que celle-ci avait une forte affinité pour la syntaxine-1 et SNAP-25, et modérée pour VAMP-2 (Daily et al. 2010). Ainsi, on peut penser que CADPS promeut la formation du complexe *trans* SNARE en interagissant directement avec ses différents partenaires.

De plus, pour contrecarrer l'hypothèse visant à qualifier CADPS comme redondante à Munc13, du point de vue interactionnelle il a été montré que ces deux protéines interagissent différemment avec la Syntaxine1. En effet, la partie C-terminale de Munc13 interagit avec la partie N-terminale de la Syntaxine, alors que la partie C-terminale de CADPS interagit avec tout le domaine cytoplasmique de la Syntaxine-1 (Parsaud et al. 2013).

Enfin, les neurotransmetteurs contenus dans les LDCV tels que la dopamine jouent un rôle fondamental pour la régulation des fonctions cognitives, les émotions, et des pathologies telles que l'addiction (Missale et al. 1998). Dans des cellules PC12, la régulation de l'exocytose de dopamine est dépendante du calcium et met en jeu l'activité du récepteur endogène D2 (Shafer and Atchison 1991). La protéine CADPS a été identifiée comme une nouvelle protéine interagissant avec le récepteur D2, au niveau de son second domaine intercellulaire en boucle (D2IC2) (Binda, Kabbani, and Levenson 2005).

Toutes ces interactions confirment l'importance que joue cette protéine dans la régulation du mécanisme de fusion vésiculaire, clé de voute de la fluctuation de notre humeur, de nos émotions.

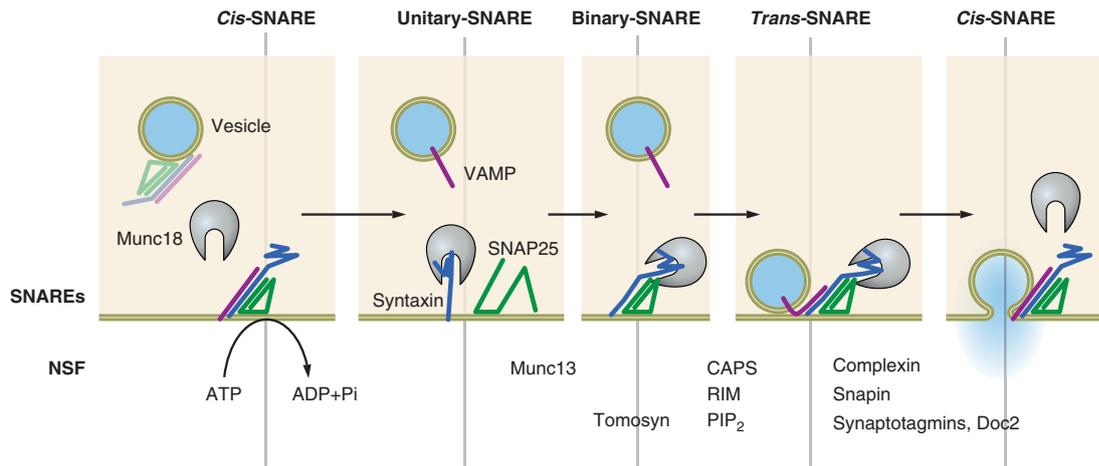


Figure I. 16. Dynamique de la formation du complexe SNARE (Kasai, Takahashi, and Tokumaru 2012).

CADPS intervient dans la formation en *trans*-du complexe SNARE pour l'arrimage de la vésicule.

4.2.7. CADPS est impliqué dans des comorbidités associées aux troubles bipolaires.

La démonstration de la fonction de CADPS dans des mécanismes neuroendocriniens ne faisant plus de doute, son impact a alors été investigué dans d'autres types cellulaires contenant des LDCV. Ainsi, il a été montré que des souris délétées pour le gène *Cadps* étaient plus intolérantes au glucose de part une sécrétion moindre d'insuline au niveau des cellules β des îlots de Langerhans du pancréas, car les LDCV sont moins présents à la surface, contiennent moins d'insuline, et fusionnent moins à la membrane (Speidel et al. 2008).

Ces conclusions sont en adéquation avec les résultats précédemment décrits dans des neurones et renforcent l'implication ubiquitaire de ce gène pour la régulation neuroendocrinienne calcium dépendante de l'exocytose. En effet, le diabète de type 2, caractérisé par une résistance à l'insuline et une diminution de sa sécrétion (Kahn, Cooper, and Del Prato 2014) sont des comorbidités largement associées à des pathologies psychiatriques telles que les troubles bipolaires (Winham et al. 2014).

4.2.8. La deuxième isoforme de CADPS est associée à des maladies psychiatriques.

Une seconde isoforme de CADPS a été identifiée par homologie de séquence avec son domaine MHD (mCPD2; GenBank/EBI accession no. AF000969). Cette nouvelle séquence très proche de CADPS1 (CADPS, CAPS) diffère seulement par l'absence ou la présence de 333pb dans la partie 5' et/ou 120pb dans la partie 3'. Ces régions correspondent à des exons individuels, il s'agirait ainsi de séquences soumises à un épissage alternatif. Ainsi, la nouvelle isoforme nommée CADPS2 (GenBank/EBI accession no. AY072800), possède 95% d'identité sur sa séquence protéique avec son orthologue murin CAPS2 et il existe une homologie de 80% entre les deux isoformes (Speidel et al. 2003).

Malgré cette forte homologie de séquence et de fonction, les expressions spatiales et temporelles des deux isoformes diffèrent largement. Car, si CAPS1 est exprimé exclusivement dans les cellules neuroendocrines et dans le cerveau, CAPS2 est aussi exprimé dans les poumons, le foie ou les organes reproducteurs. De plus, à l'intérieur même du cerveau l'expression de CAPS1 est assez différente de celle de CAPS2. Car si CAPS1 a une expression forte dans l'ensemble des neurones, CAPS2 est exprimé de manière restreinte (Speidel et al. 2003) et complémentaire à CAPS1 (Sadakata et al. 2006). Enfin CAPS1 n'est pas exprimé au cours du développement et s'active à la naissance pour atteindre son plateau à P21, alors que CAPS2 est exprimé de manière constante durant tout le développement embryonnaire.

Cette isoforme a été largement étudiée dans des modèles de souris privés de ce gène. Du fait que l'expression de CAPS2 est prédominante dans la zone granulaire du cervelet à l'âge adulte, les souris *Caps2*^{-/-} ont été étudiées pour leur capacité d'exocytose dans les cellules granulaires du cervelet (Sadakata et al. 2004). Plus particulièrement, les vésicules exprimant CAPS2 contiennent des neurotrophines, dont le NT-3 et le BDNF. Ainsi, la surexpression ou l'ablation de cette protéine induit respectivement l'augmentation ou la diminution de l'exocytose de ces deux neurotrophines (Sadakata et al. 2004; Sadakata and Furuichi 2009).

Les études génétiques et fonctionnelles ont permis d'associer cette isoforme à plusieurs maladies psychiatriques. Pour exemple, le locus 7q31-q33 de susceptibilité à l'autisme (AUTS1) englobe le gène *CADPS2* (IMGSAC 2001) et des mutations *de novo* de variations du nombre de copies du gene *CADPS2* dont une délétion de l'exon 3 (Sadakata et al.

2007) ont été reportées seulement chez des patients autistes (Abrahams and Geschwind 2008). Inversement, les souris *Caps2*^{-/-} ou délétées pour l'exon 3 décrivent des comportements autistiques (Sadakata et al. 2007; Sadakata et al. 2012; Annexe II) et une morphologie cérébelleuse identique à celle retrouvée chez des patients autistes (Sadakata and Furuichi 2009).

Chez l'Homme, une étude transcriptomique post-mortem réalisée à partir de cerveaux de patients autistes révèle une sous-expression de gènes intervenant dans des fonctions synaptiques dont *CADPS2* (Voineagu et al. 2011). Aussi, l'expression de *CADPS2* et de la version délétée de l'exon 3 est augmentée dans des cerveaux post-mortem de patient schizophrènes par rapport à des contrôles (K. Hattori et al. 2011). Une étude protéomique réalisée à partir d'hippocampes de rats stressés chroniquement a permis de montrer que l'isoforme 2 de *CADPS* (*CADPS2*) était significativement surexprimée dans le groupe anhédonique comparé au groupe contrôle (Henningsen et al. 2012).

Enfin, l'administration chronique de cortisol suivie d'un test de résilience induit une réponse positive dans la sécrétion de cortisol sérique, qui n'est pas observée chez des animaux sauvages ayant subi le même test. Ainsi, l'adaptation au stress, quantifiée par sa réponse endocrinienne est moins sensible chez les souris *Caps2*^{-/-}, suggérant une perte d'inhibition de la boucle de régulation du cortisol dans le système Hypotalamo-hypophysaire-surrénalien. Malgré tout, ces observations ne sont pas à corrélérer avec une augmentation des comportements dépressifs chez les souris *Caps2*^{-/-} comparé aux souris sauvages (Mishima et al. 2015).

Hypothèse

Bien que CADPS joue un rôle majeur dans l'exocytose des neurotransmetteurs, cette protéine demeure faiblement étudiée, et parfois même absente du schéma de l'exocytose synaptique. Or, nous avons vu que d'un point de vue génétique, fonctionnel ou même pathologique, celle-ci semble indispensable. Malgré tout, c'est dans le manque de connaissance précis et clair de son rôle que son importance est sous-estimée.

Le but de cette thèse n'est pas d'apporter des réponses fondamentales quant à la place de CADPS dans la dynamique de l'exocytose, mais plutôt de la placer dans un contexte physiopathologique pour mieux comprendre à l'échelle moléculaire les perturbations neurobiologiques à l'origine des maladies psychiatriques. En effet, comme énoncé précédemment, la seconde isoforme de CADPS (CADPS2) a été largement associée à un grand nombre de maladies psychiatriques, et on peut alors se demander qu'en est-il de CADPS1 ?

Pour cela, nous nous focaliserons sur les troubles bipolaires comme modèle d'étude, dans une dialectique allant d'études génétiques faites sur des patients ciblées pour le gène *CADPS*, à des études fonctionnelles *in vitro* réalisées à partir des données génétiques, en passant par des études plus générales sur le modèle murin hétérozygote pour *CADPS* (*Caps1^{+/-}*).

RESULTATS

1. Des mutations dans le gène *CADPS* identifiées chez des patients avec des troubles bipolaires à début précoce affectent la fonction de la protéine

Nous avons précédemment montré une liaison génétique entre la région 3p14 du génome et les formes à début précoce de trouble bipolaire (Etain et al. 2006). Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, dans cette région, le gène *CADPS* pourrait être un bon candidat pour expliquer une partie de la symptomatologie du trouble bipolaire. C'est dans ce but que nous avons réalisé une étude d'association génétique avec 176 SNP couvrant le gène *CADPS* qui nous a permis de comparer les fréquences alléliques de 452 patients avec un trouble bipolaire et 1636 témoins. Une association génétique entre le rs35462732 situé dans l'intron 21 du gène *CADPS* et le trouble bipolaire a pu être identifiée ($\chi^2=8.84$, $P=0,003$). De manière intéressante, cette même association génétique se révèle d'autant plus significative lorsque les patients étudiés sont atteints de formes à début précoce de trouble bipolaire (TBDP) ($\chi^2=11.05$, $p=0.0009$, OR=1.80, 95%CI[1.27;2.55]).

Par la suite, la recherche de mutations rares dans le gène *CADPS* a permis d'identifier 7 mutations non-synonymes et une délétion de l'exon 2 chez 8 patients à l'état hétérozygote. La plupart des mutations hormis deux d'entre-elles (N205K, R959L) ainsi que la délétion de l'exon 2, sont référencées dans les bases de données internationales. La recherche de mutations dans ce gène dans une cohorte de témoins, a permis d'identifier seulement 3 mutations non-synonymes, et n'a pas permis de retrouver celles identifiées chez les patients. Ce criblage génétique, nous a aussi permis d'évaluer un ratio entre les mutations non-synonymes par rapport aux mutations synonymes détectées; ce ratio est inversé et 3,53 fois plus élevé chez les patients comparés aux témoins (Fisher's exact test, OR=3.53, 95%CI[0.57;37.32], $p=0.13$). Ainsi, cette recherche de mutations suggère que la pression de sélection exercée sur le gène *CADPS* est diminuée chez des patients avec un TBDP. Une étude de réplication issue des données rapportées du *NHLBI GO Exome Sequencing Project* (ESP) réalisée sur une cohorte de 2203 témoins révèle un ratio de mutations non-synonymes par rapport aux mutations synonymes équivalent à celui identifié dans notre cohorte de témoins et 5 fois plus élevé que chez les patients (Fisher's exact test, OR=5.01, 95%CI [1.51; 13.06], $p=0.005$). Ces données issues d'une cohorte indépendante, confirment la tendance observée lors de notre criblage génétique et nous permet de conclure significativement sur la pression de

sélection exercée sur ce gène fortement conservé entre différentes espèces, pour prévenir la survenue d'un TB.

Lors de ma thèse, aux vues de ces résultats génétiques prometteurs nous avons décidé d'étudier spécifiquement les mutations non-synonymes détectées chez les patients atteints d'un trouble bipolaire à début précoce, dans le but de confirmer cette association.

Tout d'abord, les études *in-silico* réalisées grâce aux logiciels de prédiction poly-phen2 et SIFT nous informent que la plupart de ces mutations auraient un effet délétère sur la fonction de la protéine CADPS. L'expression transitoire des différentes isoformes, dans des cellules COS nous montre que deux d'entre elles : R195L (unpaired t test, $t(32)=2,183$; $p=0,03$) et S399L (unpaired t test, $t(33)=1,995$; $p=0,02$), ont une expression protéique significativement plus faible que la forme sauvage de CADPS. Cette sous expression n'est pas due à un défaut de transcription de ces deux isoformes, mais plutôt issue d'un défaut de stabilité de ces protéines mutantes, particulièrement pour celle contenant la mutation S399L. En effet, en présence de cycloheximide le temps de demi-vie de l'isoforme S399L est atteint au bout de seulement 8h d'incubation alors qu'il faut 24h pour la forme sauvage (Two-way ANOVA, genotype effect, $F(3,50)=3,77$, $p=0,02$). Malgré tout, un traitement pendant 48h au lithium dans les conditions physiologiques ne permet pas de restaurer cette sous-expression.

Deuxièmement, nous avons voulu tester la capacité de chargement vésiculaire en sérotonine de cellules CHO exprimant de manière constitutive le transporteur vésiculaire VMAT1, contenant les différentes isoformes de CADPS. Nous avons montré que deux mutations : R195L (unpaired t test, $t(20)=2,955$; $p=0,008$) et L482I (unpaired t test, $t(24)=2,807$; $p=0,01$) diminuaient de manière significative le chargement vésiculaire en sérotonine comparé à la forme sauvage de CADPS.

Troisièmement, nous avons voulu tester la capacité de libération de catécholamines dans des cellules PC12, contenant les différentes isoformes de CADPS. Nous avons montré que trois mutations : $\Delta E2$ (paired t test, $t(7)=5,030$; $p=0,001$), N1017I (paired t test, $t(5)=5,502$; $p=0,003$), L482I-N1017I (paired t test, $t(5)=6,394$; $p=0,001$) diminuaient de manière significative la libération de catécholamines. De plus, en collaboration avec le laboratoire du Pr. Nils Brose au Max Planck Institute, nous avons voulu tester cette même fonction d'un point de vue électrophysiologique dans un modèle de neurones de souris privées de *Cadps* (*Caps DKO*). Nous avons montré que

deux mutations : $\Delta E2$, S399L altéraient significativement des paramètres électrophysiologiques de neurones autaptiques d'hippocampe, ainsi que leur plasticité quand *Cadps* était délété de l'exon 2.

L'ensemble de ces résultats génétiques, fonctionnels et électrophysiologiques démontrent pour la première fois que ce gène pourrait jouer un rôle fonctionnel pour la prédisposition génétique dans les formes à début précoce troubles bipolaires.

ARTICLE 1

Mutations in *CADPS* identified in patients with bipolar disorder affect protein functions

Jérémy Sitbon^{1,2,3}, Denis Nestvogel⁴, Caroline Kappeler^{1,2,3}, Aude Nicolas^{1,2,3}, Annabelle Henrion^{1,2,3}, Bruno Etain^{1,2,3,5}, Marion Leboyer^{1,2,3,5}, JongSeop Rhee⁴ and Stéphane Jamain^{1,2,3,*}

Mutations in *CADPS* identified in patients with bipolar disorder affect protein functions

Jérémy Sitbon^{1,2,3}, Denis Nestvogel⁴, Caroline Kappeler^{1,2,3}, Aude Nicolas^{1,2,3},
Annabelle Henrion^{1,2,3}, Bruno Etain^{1,2,3,5}, Marion Leboyer^{1,2,3,5}, JongSeop Rhee⁴ and
Stéphane Jamain^{1,2,3,*}

¹ *INSERM U955, Psychiatrie Translationnelle, Créteil, France;*

² *Université Paris Est, Faculté de Médecine, Créteil, France;*

³ *Fondation FondaMental, Créteil, France;*

⁴ *Department of Molecular Neurobiology, Max Planck Institute of Experimental
Medicine, Göttingen, Germany;*

⁵ *AP-HP, Hôpital H. Mondor – A. Chenevier, Pôle de Psychiatrie, Créteil, France*

*Corresponding authors:

Dr Stéphane Jamain

Inserm U955, Psychiatrie Translationnelle

Faculté de Médecine, 8 rue du Général Sarrail, Créteil, 94000, France.

Phone: +33 1 49 81 37 75

Fax: +33 1 49 81 35 88

E-mail: stephane.jamain@inserm.fr

Abstract

With a prevalence of 1% in general population, bipolar disorder is one of the most severe and common psychiatric disorders. Many studies suggest a preponderant role for genetic factors in bipolar disorder, mainly in early-onset form of the disease. However molecular mechanisms underlying this disorder remain unclear. We identified missense variations and one deletion in a gene encoding the calcium-dependent activator protein for secretion (CADPS) in patients with early-onset bipolar disorder. CADPS is an essential regulator of synaptic and large dense core vesicles exocytosis in mammalian neurons and neuroendocrine cells, respectively. Moreover, CADPS promotes vesicular catecholamine uptake and storage mediated by vesicular monoamine transporters. In this study, we showed a higher mutation frequency in patients with early-onset bipolar disorder than in unaffected controls. In cellular models, the CADPS functions were affected by the mutations identified in patients. Some mutations resulted in a decreased expression level of the protein. Others impaired the ability of CADPS to promote the vesicular monoamine uptake *in vitro* or to increase the calcium-dependent neurotransmitter release in PC12 cells. Physiological exploration of mutants in rat hippocampal neurons suggested modification in synaptic plasticity. Altogether, our results suggest that impairment in CADPS functions may affect Ca²⁺-dependent signalling pathway. Such mutations may thus increase the vulnerability to early-onset bipolar disorders in humans.

Introduction

Bipolar disorder (BD) is a chronic psychiatric mood disorder with a lifetime cumulative risk of 1% in the world-wide population and which leads to a social withdrawal in two-thirds of patients.¹ Twins and family studies demonstrated a genetic component of BD with an estimated heritability ranging between 60% and 80%.² However, biological mechanism disturbances involved in this disease remain unclear. Many genome-wide linkage analyses have revealed a vulnerability locus for BD on chromosome 3p14-p21,^{3,4} mainly in the early-onset form of the disease.⁵ Recent large-scale genome-wide association studies suggested several candidate genes in this region.⁶⁻¹¹ However, no functional mutation has been reported yet in none of them.

BD involves perturbations in molecular mechanisms governing the machinery of exocytosis and thereby regulation of neurotransmitter release.¹²⁻¹⁵ Exocytosis and recycling of synaptic vesicles are crucial mechanisms for neuronal communication, which governs the essential brain functions including sensory processing, cognitive control, emotion regulation and behavioural states. When an action potential depolarizes the presynaptic plasma membrane, Ca^{2+} flows through Ca^{2+} channels into the nerve terminal to trigger the exocytosis of synaptic vesicles, thereby releasing their neurotransmitters into the synaptic cleft.^{16,17} There is growing evidence of the major role of Ca^{2+} and Ca^{2+} channels in the onset of BD.^{9,12,18} In this study, we explored the role of a new candidate gene on chromosome 3p14, which encodes the Ca^{2+} -dependent activator protein for secretion (*CADPS*). *CADPS* were initially identified as a cytosolic regulator of Ca^{2+} -dependent secretion in PC12 chromaffin cells.¹⁹ Further animal model studies showed this protein is essential for dense core and synaptic vesicles priming and docking at plasma membrane.²⁰⁻²³ Membrane

fusion mediating vesicle exocytosis is dependent of the soluble *N*-ethylmaleimide sensitive factor-associated protein receptor (SNARE) protein complex assembly.²⁴ CADPS promotes the SNARE complex assembly by directly binding the synaptosomal associated protein of 25 kDa (SNAP25), syntaxin-1A (STX1A) and with a lower affinity the vesicle-associated membrane protein 2 (VAMP2),²⁵ which have both been associated with psychiatric disorder vulnerability.^{13,14,26,27} Moreover, it has been demonstrated that CADPS promotes vesicular monoamine uptake by dense core vesicles.^{23,28,29}

Here, we report an association study as well as a mutation screening in *CADPS* in patients with early-onset BD. Few functional domains in CADPS are required for its functions: a dynactin-interacting domain (DID) involved in the vesicle trafficking process to transport the dense-core vesicles through the axon and dendrites of neurons; a C2 domain involved in targeting proteins to cell membranes via Ca²⁺ ions; a central pleckstrin homology (PH) domain, which binds PI(4,5)P₂ for plasma recruitment;^{30,31} a Munc13 homology domain-1;^{32,33} and a Dense Core Vesicle Binding (DCVB) domain for exocytosis. Through this protein structure and function, we assume that mutations in *CADPS* may affect neurotransmission and thus increase the vulnerability to psychiatric disorders such as BD. We thus explored the consequences of mutations identified in patients on the multiple functions of the protein and showed that most of these mutations impact the function of CADPS and thus alter neurotransmission.

Material and Methods

Subjects

One-hundred-and-thirty two patients with BD were recruited into two French university-affiliated psychiatry departments (Paris-Créteil and Bordeaux). Patients were interviewed by a trained psychiatrist using the *diagnostic interview for genetic studies* (DIGS)³⁴ and included according to the DSM-IV³⁵ criteria for BD type I or II with an age at onset lower than 22. The age at onset was defined as the age of first thymic episodes (depressive, manic or hypomanic) and determined by reviewing medical case notes and information from semi-structured interviews. The threshold for early-onset BD was defined as 22, based on previous admixture analyses.³⁶

One-hundred-and-eighty-four French healthy subjects with neither personal nor family history of psychiatric disorder were recruited as controls.

The research ethics board of the Pitié-Salpêtrière Hospital approved protocols and procedures and written informed consent was obtained from all subjects prior to participation in the study.

Genotyping and copy-number variation detection

DNA was isolated from lymphocytes either directly from venous blood sample or after transformation by Epstein Barr virus as previously described.¹⁴ DNA from patients with BD was genotyped using HumanHap550 BeadArrays (Illumina, San Diego, CA, U.S.A.) at the *Centre National de Génotypage* (CEA, Evry, France) and imputed according to the CEU population of the HapMap project.³⁷ Case/control association analyses were performed using the PLINK software v1.07.³⁸ Copy number variations were detected by comparison of the fluorescence level over the whole chromosome and by loss of heterozygosity using the SniPeep software (R. Toro, Institut Pasteur,

France). The exon 2 deletion of *CADPS* was confirmed by quantitative polymerase chain reaction (PCR) analysis using one internal and two external couples of primers and Mesa Green qPCR master mix plus (Eurogentec, Liege, Belgium). PCR were performed and run in a Mastercycler ep realplex2S (Eppendorf, Hamburg, Germany) for the deleted patient and two unaffected controls, known to have no deletion in the regions under study. Each real-time PCR was performed in triplicate and assessed by comparing C_T at a determined threshold between the three amplicons and the three individuals.

Mutation screening

The *CADPS* coding region and exon-intron boundaries were amplified by PCR for patients and controls. PCR products were sequenced by the Sanger's method using both forward and reverse specific primers and the BigDye terminator v3.1 cycle sequencing kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, U.S.A.) and run on a 16-Capillary ABI PRISM 3130xl genetic analyser as previously described.¹⁴ All primers and PCR conditions are available on request. Sequence chromatograms were analysed using GenalyseCarbon 2.8.2b.³⁹

Cloning and in vitro mutagenesis

Human cDNA of *CADPS* isoform 1 (NM_003716.3) has been obtained from clone hh10147 (ORK04421) provided by the Kasuza DNA Research Institute (KDRI, Chiba, Japan) and subcloned into pcDNA3.1 plasmid (Life Technologies, Carlsbad, CA, U.S.A.) using the KpnI restriction enzyme. We then used QuickChange Site-Directed Mutagenesis kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, U.S.A.) in order to introduce

mutations identified in patients with BD by *in vitro* mutagenesis. The sequence of all plasmids has been checked by Sanger's method.

Protein quantification

COS cells were cultured in Gibco™ GlutaMAX™ supplemented Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) with 10% bovine foetal serum, 100U/ml penicillin and 100µg/ml streptomycin at 37°C, 5% CO₂. Fifty-thousands COS cells were transfected with 0.8µg of wild type and mutant CADPS containing plasmid DNA using 2µl of TurboFect™ transfection reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), according to manufacturer's protocol. After 48 hours, cells were harvested in PBS, 1% Triton X100 and equal protein quantity was loaded on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Protein amount was quantified by immunoblotting using antibodies against CADPS (sc-136402, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), the green fluorescent protein (GFP, A6455, Life Technologies), and α-tubulin (TUBA, T5168, Sigma Aldrich).

In addition, COS cells have been grown with complete Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 100µg/ml of cycloheximide (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MI, USA) and incubated for up to 24 hours at 37°C with 5% CO₂. Cells were harvested after 5, 8, 10 and 24 hours of culture before to be analysed by Western blot assays as described above.

Vesicular exocytosis in PC12 cells

PC-12 cells were cultured in GlutaMAX™ supplemented Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium with 10% horse serum, 5% foetal bovine serum, 100U/ml penicillin and 200µg/ml streptomycin at 37°C in a humidified 10% CO₂

incubator on plates pre-coated with a 0.1g/l of human collagen IV solution diluted in 0.1M acetic acid. Two million cells were electroporated with 6.6µg of plasmid DNA using Amaxa® Cell Line Nucleofector™ Kit V and Nucleofector™ device according to manufacturer's protocol (Lonza, Basel, Switzerland). The day after, electroporation efficiency was checked using GFP on fluorescent microscope and cells were incubated with 20µM of Fluorescent False Neurotransmitter 511 (FFN511)⁴⁰ diluted in 100µl of Krebs-Ringer buffer: 10mM HEPES, 140mM NaCl, 5mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 2mM CaCl₂, 14.3mM NaHCO₃, 5mM Glucose, 0.1mM EGTA, for 1 hour at room temperature. Cells were washed three times with 500µl of Krebs-Ringer and incubated for 1 hour with Krebs-Ringer buffer. Exocytosis was triggered with a 100µl solution of Krebs-Ringer buffer supplemented with 60mM KCL, 80mM NaCl and 1mM EGTA at room temperature. Supernatant were collected after 1 minute exocytosis and read at 501nm with Infinite® 200 PRO microplate reader (Tecan, Männedorf, Switzerland).

Vesicular monoamine uptake assays in CHO cell lines

Chinese Hamster Ovary (CHO) cell lines, constitutively expressing the *Slc18a1* gene, encoding the vesicular monoamine transporter VMAT1 (CHOVMAT1), were provided by Pr. Ahnert-Hilger (Charité Center, Berlin, Germany). CHOVMAT1 cells were cultured at 37°C, 5% CO₂ in DMEM/Hams' F-12 medium supplemented with 10% foetal bovine serum, 2mM Gibco™ GlutaMAX™ (Thermo Fisher Scientific), 100U/ml penicillin, and 100µg/ml streptomycin (Thermo Fisher Scientific) with 400µg/ml Geneticin (Thermo Fisher Scientific). Cells were transfected with wild type and mutant *CADPS* DNA using Lipofectamine™ 2000 (Thermo Fisher Scientific), according to manufacturer's instruction. Twenty-four hours after transfection, cells

were trypsinized and diluted in 1ml Potassium Glutamate (KG) buffer, containing 150mM potassium glutamate, 20mM 1,4-piperazinediethane-sulfonic acid, 4mM ethylene glycol tetraacetic acid and 1mM MgCl₂, adjusted at pH 7.0 with hydroxide potassium. One million cells were permeabilized with streptolysin O.⁴¹ Serotonin uptake was measured using 5-Hydroxy-tryptamine,[H³]-trifluoroacetate (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) and liquid scintillation counting by a Packard 1600TR Tri-Carb Liquid Scintillation Analyzer (Perkin Elmer).

Electrophysiological recording of autaptic hippocampal neurons

Autaptic hippocampal neurons were prepared from hippocampal neuroblasts of e18 CAPS1/CAPS2-deficient (DKO) mice, as described previously.²¹ Cells were whole-cell voltage clamped at -70 mV with an EPSC10 (HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH., Lambrecht/Pfalz, Germany) under control of the Patchmaster 2 program (HEKA). All analyses were performed using AxoGraph 4.1 (Axon Instruments Inc., Foster City, CA, U.S.A.) and MiniAnalysis (Synaptosoft Inc., Decatur, GA, U.S.A.). The ready-releasable pool (RRP) size was determined by a 6s application of the external saline solution made hypertonic by the addition of 0.5M sucrose. Recordings of mEPSCs were performed in the presence of 300nM tetrodotoxin (TTX). EPSCs were evoked by depolarizing the cell from -70 to 0 mV for 2 ms. The effect of high-frequency stimulation on the amplitude of EPSCs was measured by applying depolarisations at frequencies of 2, 5, 10 and 40Hz for 100 stimuli. Statistical significance was tested using Student's t test.

Statistical analyses

Data are presented as mean \pm standard deviation. Statistical testing was performed using Prism 6 software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, U.S.A.). Condition comparisons included parametric tests (Student t test / ANOVA) and non-parametric tests (Mann-Whitney U test / Kruskal-Wallis test), according to normality of distribution, tested using the Shapiro-Wilk method. Differences were considered significant for p -values lower than 0.05.

Results

CADPS is associated with early-onset bipolar disorder

CADPS is a huge gene spanning 477,044bp on chromosome 3p14. In order to determine whether common polymorphisms in this gene might be associated with BD and explain genetic linkages frequently reported on 3p14, we genotyped 176 ht-SNPs in 452 patients with BD and 1,636 controls. The biggest difference in allele frequencies between patients and controls was observed for rs35462732 ($\chi^2=8.84$, $p=0.003$) (Figure 1a). Genetic linkages identified in this region were specific for patients with early-onset BD.⁵ We thus restricted our sample to 203 patients with an age at onset lower than 22 and showed that the difference in allele frequencies for rs35462732 was even larger ($\chi^2=11.05$, $p=0.0009$, OR=1.80, 95%CI[1.27;2.55]) (Figure 1a). This SNP has not been genotype by the Psychiatric Genomic Consortium (PGC) Bipolar Disorder Group⁹ and no information on allele frequency was available for it. However, 4 SNPs (rs9872498, rs1238394, rs833638 and rs17651503) in *CADPS*, which showed a difference in allele frequencies with a $p<0.01$ between the 7,481 patients with BD and the 9,250 control individuals of the PGC study. These SNPs were located 100kbp downstream to rs35462732 (lowest p-value for rs833838, $p=0.004$).

Missense variations in CADPS are more frequent in patients with BD than in unaffected individuals

The common polymorphism rs35462732, which was the most associated with early-onset BD, was located in intron 21 of *CADPS* and the odds ratio observed for this SNP was not able to explain the multiple genetic linkage previously reported in this region. We thus sequenced the 31 coding exons as well as regulatory regions of the

3 RefSeq isoforms of *CADPS* (NM_003716.3, NM_183393.2 and NM_183394.2) in order to determine whether rare functional variations in this gene may contribute to increase BD vulnerability. Six missense variations and 4 synonymous variants were identified in 132 patients with early-onset BD (Supplementary table 1). One of these variations (p.N1017I) has been found twice in patients and once in controls. Note that one of the two patients, who carried the p.N1017I variation had another missense variation on the same allele (p.L482I) (Figure 1b). In the 7 families in which mutations were identified, 100% of subjects with a mutation in *CADPS* had a phenotype whereas this frequency decreased to 33% in unmutated subjects (Fisher's exact test, OR=3.36, 95%CI[1.61;+∞], $p=0.008$) (Figure 1c). Only 3 missense variations were found in 184 unaffected controls, including p.N1017I, which is a frequent polymorphism. Note that when considering only rare variations (allele frequency lower than 0.001), the missense variation frequency was three times higher in patients than in controls (Fisher's exact test, OR=3.53, 95%CI[0.57;37.32], $p=0.13$) and five times more frequent in patients than in the European population of the Exome variant database (Fisher's exact test, OR=5.01, 95%CI[1.51;13.06], $p=0.005$) (Table 1, Supplementary Figure S1). In contrast, no significant difference was observed for synonymous variations between these three populations (Supplementary Figure S1). We supplemented our analysis by looking for copy number variations in our cohort of patients and identified a 9kbp deletion removing the exon 2 (p.I148_E185del). As exon 2 is composed of 114 nucleotides, its deletion resulted in a protein shortened of 38 amino acids in the dynactin-binding domain, which has been shown to be necessary for a proper localisation in the brain of *CADPS*.⁴² No similar deletion was reported in the Database for Genomic Variants (<http://dgv.tcag.ca/>).

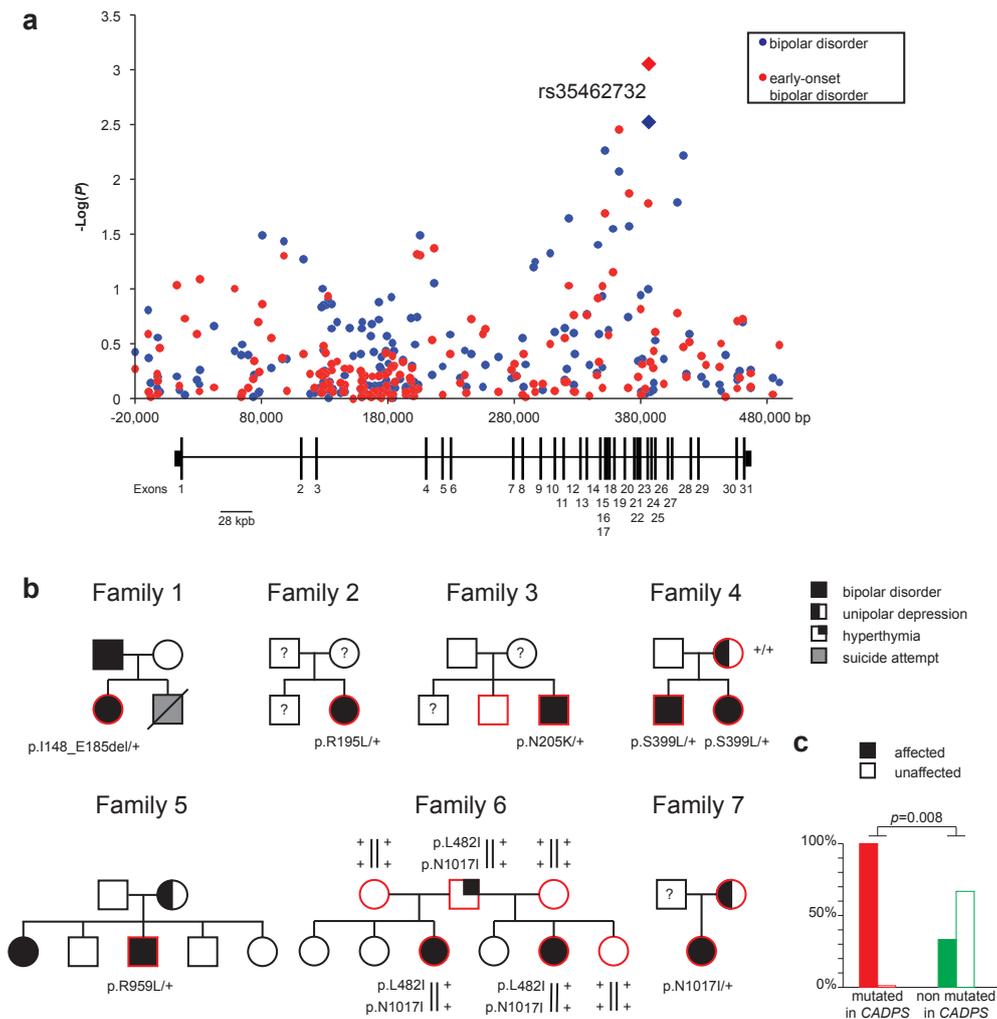


Figure 1. Genetic exploration of CADPS in patients with BD. (a) Manhattan plot showing results of association studies conducted with 176 ht-SNPs spanning *CADPS* on 456 patients with BD (blue) or 203 patients with early-onset BD (red) and 1,636 control individuals. Diamonds represent the most significantly associated SNP. The x-axis is the gene position according to NM_003716.3 and the y-axis is the $-\log_{10}P$ -value. (b) Family pedigrees of early-onset BD patients with mutation in *CADPS*. Affected individuals are shown in black, with filled symbol for BD, half-filled symbol for unipolar depression and quarter-filled symbol for hyperthymia. Individuals for whom DNA was available are shown with a red border. (c) Comparison of disease probability in mutated and non-mutated subjects in families identified with mutation in *CADPS*.

Missense variations in CADPS identified in patients with BD affect the protein level

The higher mutation rate observed for patients with early-onset BD as compared with control individuals, suggest such variation may increase BD vulnerability. In silico analysis of these variations suggested that 4 out the 6 missense mutations identified in patients were predicted to have a damaging impact on the protein function (Supplementary Table 1). In order to determine whether these variations affected the function of CADPS, we transfected either the wild type or mutant *CADPS* in multiple cell lines. Quantification of the protein level in COS cells was performed by western blot analysis and showed a 40% and 33% decrease in protein expression level for p.R195L and p.S399L, respectively (Figure 2a and 2b). This was confirmed both in CHO and PC12 cells with a similar reduction of the protein level, whereas no difference in RNA level was observed for these variants (not shown). In order to check the protein stability, we applied 100µg/ml of cycloheximide for 24h on cell cultures and measured the protein level over time. This showed a faster degradation of the protein with the p.S399L mutation. For this mutated protein, the half-life was decreased of a factor 3 (Figure 2c).

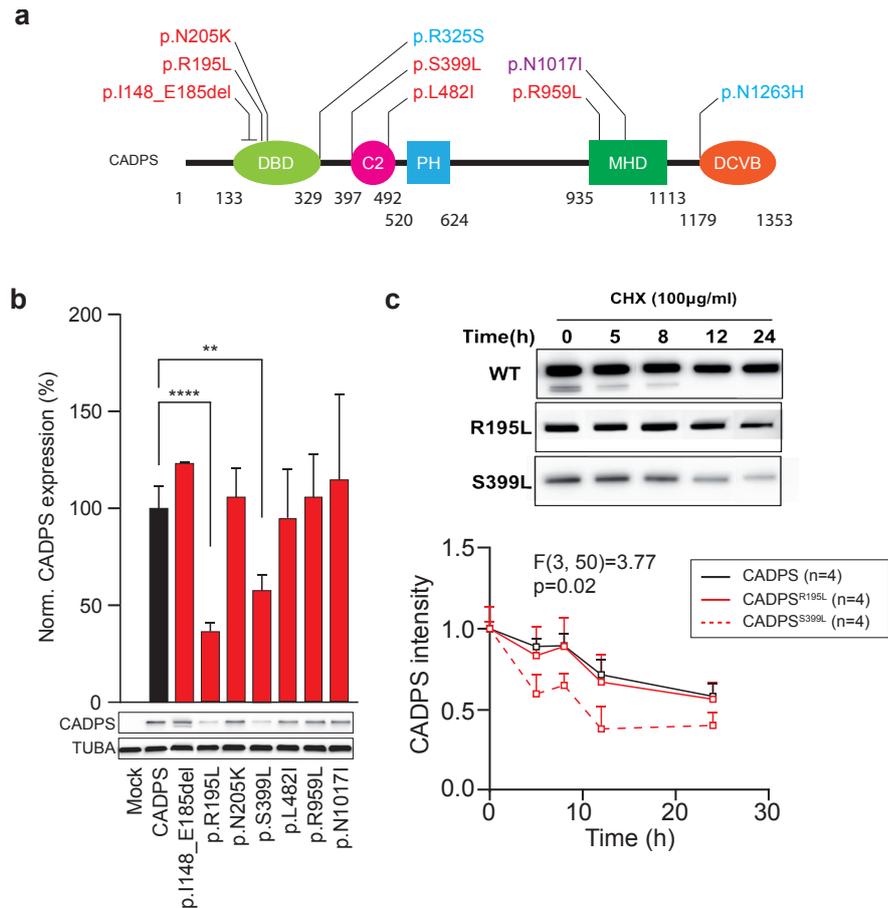


Figure 2. Characterization of missense variations identified in *CADPS*. (a) Protein location of missense mutations identified in patients with an early-onset BD (red), unaffected controls (blue), or both (purple). (DBD) dynactin binding domain; (C2) C2 domain; (PH) pleckstrin homology domain; (MHD) munc homology domain; (DCVB) dense core vesicle binding domain. (b) Protein expression level of wild-type and mutant isoforms of *CADPS*. Protein level has been evaluated by Western-blot assay in transiently transfected COS cells using antibody directed against *CADPS* and TUBA. (c) Two under-expressed mutant isoforms of *CADPS* containing either the p.R195L or the p.S399L mutations were evaluated for protein stability. Transfected COS cells were treated with 100µg/ml cycloheximide (CHX) over a 24 hours time period. Cell lysates were subjected to Western blot analysis with anti-*CADPS* and quantified before to be plotted on graph. The value of untreated cells was set as 1. Data represent the means ±SD of 2 independent experiments. The p.S399L mutation significantly decreases the half-life of the protein by a factor 3.

CADPS functions are affected by missense variations identified in patients with BD

Multiple functions have been shown for CADPS in vesicular exocytosis mechanisms. CADPS has been first demonstrated to play a role in Ca^{2+} -dependent exocytosis of secretory vesicles.^{19,21} In order to determine whether some of these functions might be affected by the mutations that we have identified in patients with BD, we used two complementary approaches. First, we transiently transfected neuroendocrine PC12 cells with wild type or mutant *CADPS*. In order to measure neurotransmitter release, we used FFN511 as substrates for the synaptic vesicle monoamine transporter.⁴⁰ Neurotransmitter release was measured after increasing intracellular Ca^{2+} concentration (Figure 3a and 3b). First, we showed 50% increase in vesicular exocytosis when wild type CADPS was expressed in PC12 cells as compared with empty vector (Paired Student t test, $t=11.88$, $df=25$, $p<0.0001$, Figure 3). Interestingly, we showed that the CADPS ability to promote FFN511 release was totally impaired when CADPS lacked exon 2 (Paired Student t test, $t=5.03$, $df=7$, $p=0.001$) or when CADPS carried two mutations, p.L482I and p.N1017I, affecting both the C2 domain and the MHD1 domain (Paired Student t test, $t=6.39$, $df=5$, $p=0.001$; Figure 3c). Interestingly, release was partially impaired when only p.N1017I was present in the protein (Paired Student t test, $t=5.50$, $df=5$, $p=0.003$), suggesting these two mutations may have a cumulated effect on vesicular release.

As no significant difference was observed for other mutants, we checked whether those might affect the other function of CADPS. Indeed, former studies demonstrated that CADPS was also able to promote vesicular monoamine uptake and storage in cell lines and brain.^{23,28,29} We thus transiently transfected VMAT1-expressing CHO cell lines (CHOVMAT1) with wild type and mutant forms of *CADPS* and measure

serotonin uptake *in vitro* as described.²⁸ We showed that serotonin uptake was 50% increased when CHOVMAT1 cells were transfected with wild type CADPS as compared with empty vector (Unpaired Student t test, $t=4.26$, $df=24$, $p=0.0003$; Figure 3d), confirming the ability for CADPS to potentialize the vesicular monoamine uptake *in vitro*. Two mutations, p.R195L and p.L482I, impaired the CADPS ability to promote uptake (Unpaired Student t test, $t=2.95$, $df=20$, $p=0.008$ and $t=2.81$, $df=24$, $p=0.01$ for p.R195L and p.L482I, respectively; Figure 3d).

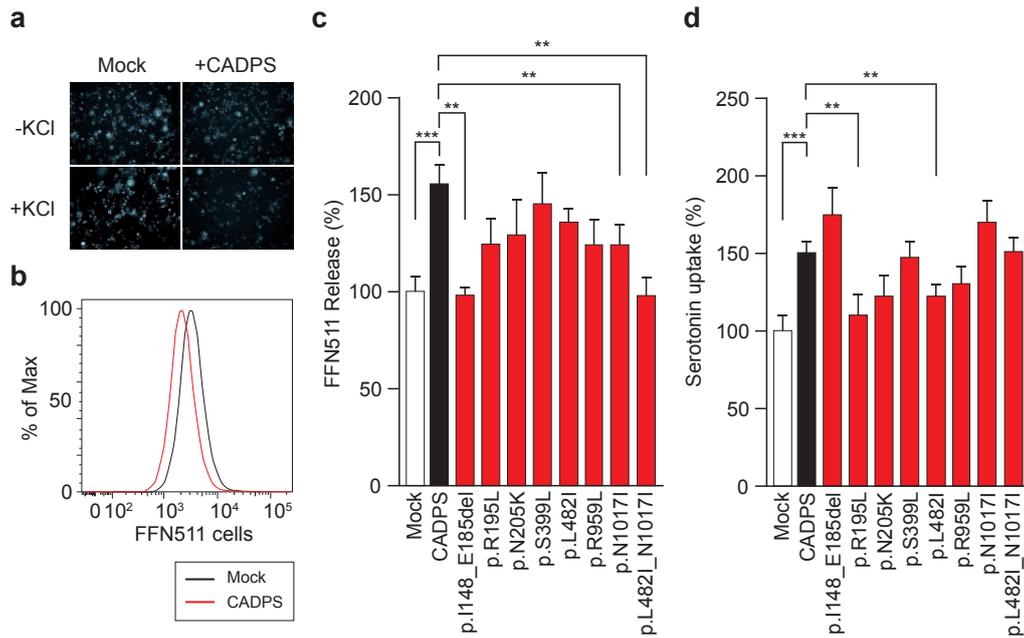


Figure 3. Mutations in CADPS gene decreased the FFN511 release and monoamine uptake. PC12 cells were electroporated with vector containing CADPS mutations. In the evoked-exocytosis Krebs-Ringer buffer containing 90mM KCl, release of FFN511 after 1min is higher for cells containing CADPS than the mock, as seen in cells by microscopy (a) or by FACS (b). (c) Release of FFN511 from PC12 cells has been compared between wild type and cells transfected with mutated CADPS. Data represent the means \pm SD of 3 independent experiments. Exocytosis of FFN511 was significantly decreased for p.I148_E185del, p.N1017I and the double mutant p.L482I_N1017I, indicating that these mutations altered the released of vesicular monoamines. (d) VMAT1 expressing CHO cells were transfected either with wild type or mutant CADPS and serotonin transport with VMAT1 was compared. Serotonin uptake occurred for 10min a 37°C using a solution of potassium-glutamate-ATP containing 40nM[H3]serotonin and 100 μ M of no-labeled serotonin. Data represent the means \pm SD of 3 independent experiments. Serotonin uptake was significantly reduced for p.R195L and p.L482I mutants, suggesting these mutations altered the CADPS ability to promote monoamine uptake.

Partial Truncation of the Dynactin-Interacting-Domain of CADPS leads to enhanced short-term synaptic depression

We then assessed the ability of the 7 CADPS mutants to reverse the secretory deficits of CADPS/CADPS2-deficient (CADPS/CADPS2 DKO) hippocampal neurons.²¹ All mutants were able to rescue the dramatic decrease of EPSC amplitude observed in CADPS/CADPS2 DKO (Table 1). However, the p.I148_E185del mutation resulted in a higher vesicular release probability (Figure 4), as well as an increase in mEPSC frequency as compared to wild type CADPS. In addition, when applying a train of stimuli at 2, 5, 10 or 40Hz, expression of CADPS^{I148_E185del} in CADPS/CADPS2 DKO neurons resulted in stronger depression than did CADPS expression (Figures 4), which was consistent with the increased release probability. In contrast, for the p.S399L mutant, we observed an increase of the paired pulse ratio (Figure 4) after a train of 100 action potentials at 2, 5 or 40Hz.

Altogether, our results showed that most of the mutations identified in patients with early onset BD resulted in functional abnormalities *in vitro* of CADPS (Supplementary Table 1), suggesting that mutation in this gene may result in vesicular exocytosis dysfunction and thus increase the risk of developing bipolar disorder.

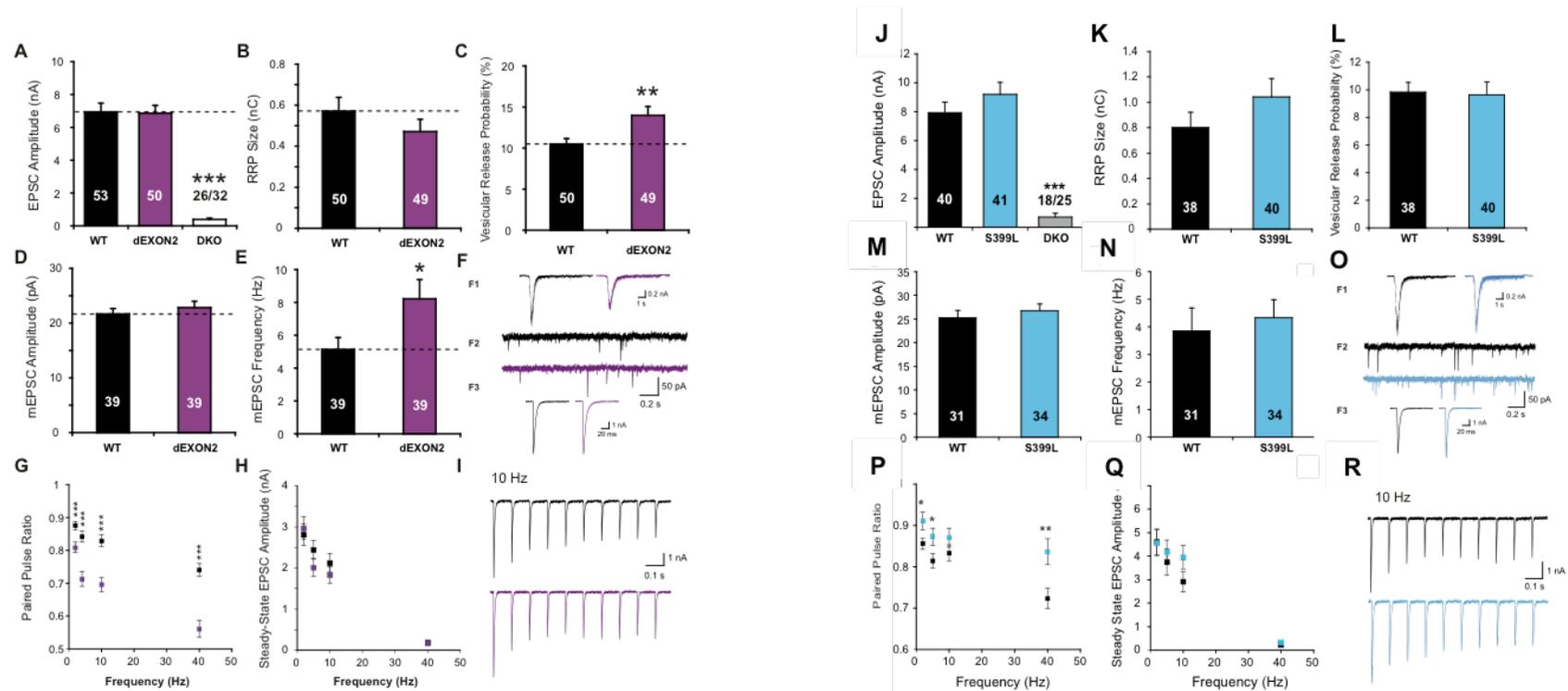


Figure 4. Physiological consequences of two mutations in CADPS. Lentiviral expression of the exon 2 deletion (Δ Exon2-CADPS1 in purple) and the p.S399L mutation (S399L-CADPS1 in blue) rescues action potential (AP) amplitude (a, j) and sucrose-evoked EPSCs amplitude in autaptic hippocampal CAPS DKO neurons (d,m), whereas frequency was increased for the exon 2 deletion compared with wild type CADPS (e) and was unchanged for the p.S399L mutant (n). The vesicular release probability was increased in p.I148_E185del expressing neurons (c), which exhibited lower paired pulse ratio during trains of APs (g) in contrast to the p.S399L mutant which showed a higher paired pulse ratio (p).

Discussion

In this article, we combined evidences that variations in *CADPS* may increase the vulnerability to bipolar disorder. We first demonstrated that common polymorphisms in *CADPS* were more frequent in patients with BD than in control population and showed this difference was even greater when only patients with an early age at onset were considered. This association was strengthened by difference in allele frequencies observed in large populations of patients with BD and controls from the PGC.⁹ It was also consistent with previous genetic studies, which reported a genetic linkage between BD and the 3p14 region, mainly with early-onset BD.³⁻⁵ Early-onset bipolar disorder has long been demonstrated to correspond to a homogeneous subgroup of patients with a higher genetic component than later forms.⁴³⁻⁴⁸

Early-onset BD looks to have a similar aetiology than adult BD with small effect for common polymorphisms and larger effects for very rare variants.⁴⁹ Looking for rare variations in patients with early-onset BD, we showed the missense variation frequency was between 4 and 5 times higher than in control populations, in contrast to synonymous variations for which no significant difference was observed. This difference between synonymous and nonsynonymous substitution rates in patients and controls suggest that most of the rare missense variations may have functional consequences subjected to purifying selection. All missense variations identified in patients with BD were predicted, by at least one software, to alter protein function (Supplementary Table 1). We confirmed these alterations by *in vitro* or *ex vivo* experiments for all of them but two (p.R959L and p.N205K) (Supplementary Table 1). Our *in vitro* experiments showed that the *CADPS* mutations identified in patients with BD may affect either the amount of the protein (p.R195L and p.S399L), the Ca²⁺-dependent exocytosis (p.I148_E185del and p.N1017I) or the ability of *CADPS* to

promote monoamine uptake (p.R195L and p.L482I). Results on monoamine uptake and release assays suggest different domains of CADPS may regulate distinct function of the protein, as previously shown for CADPS2.⁵⁰ Interestingly, the exon 2 deletion (p.I148_E185del) showed a higher vesicular release probability and a higher mEPSC frequency than wild type CADPS. This result is consistent with multiple studies on human induced pluripotent stem cells-derived neurons, which showed that BD neurons fire more often and with higher wave amplitude than control neurons.^{15,51,52} In addition, this mutant showed a stronger depression when applying a train of action potentials suggesting that this mutation may result in an alteration of synaptic plasticity, which has been widely reported to play a key role in BD pathophysiology and therapeutics.⁵³ More generally, our results suggest that abnormalities in Ca²⁺-dependent exocytosis may increase the risk of developing an early-onset form of BD and thus confirmed previous report of association between SNAP25, a direct binding partner of CADPS,²⁵ and early-onset BD.¹⁴ Numerous genetic studies have reported calcium signalling as the most associated pathway with BD,^{9,12,18} which may have an impact on the age at onset of the disease.⁵⁴ In addition, calcium signalling is the most replicated affected pathway in cellular models of BD.⁵⁵

CADPS has been shown to trigger synaptic and large dense-core vesicle exocytosis.^{19,21-23} All mutated patients in our study were heterozygous for CADPS mutations, which was not surprising since homozygous mutant mice for *Cadps* die at birth.²³ Interestingly, two mutations showed a significant lower protein level in transfected cells. Adult heterozygous mutant mice for *Cadps* showed a significant reduction of CADPS and have a reduction of the readily releasable pool and a reduction of catecholamine secretion.²³ Variations in catecholamine and monoamines

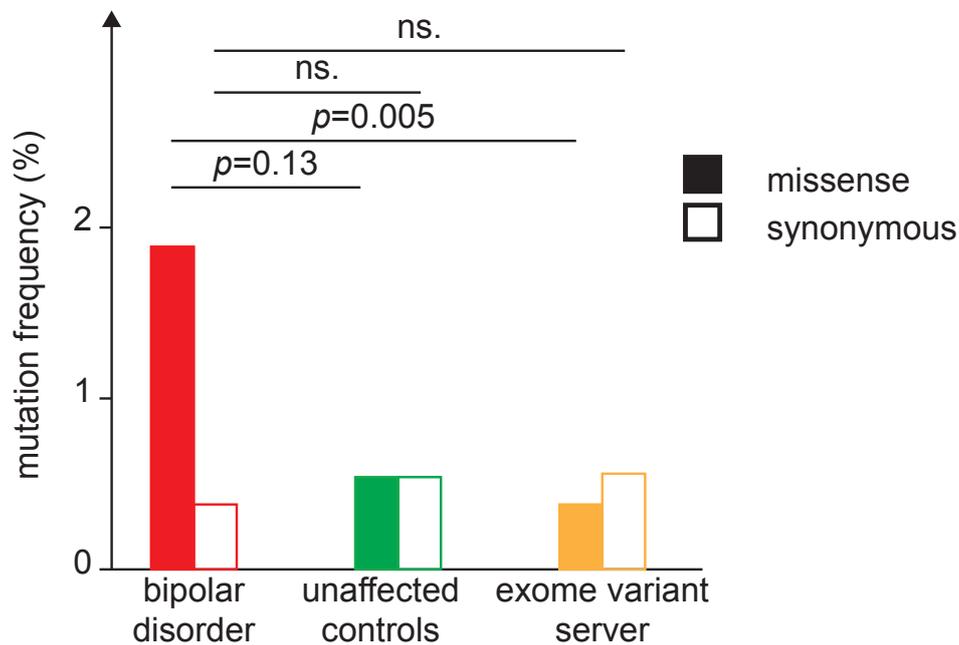
have been widely documented in patients with BD and are the target of many antidepressant and antipsychotic treatments.⁵⁶

In summary, our genetic studies provide for the first time evidence that functional mutations in *CADPS* may increase the risk of developing early-onset BD. This risk may result from alteration in Ca^{2+} -dependent exocytosis mechanisms. More generally, these results suggest that other genes involved in synaptic and neuroendocrine transmission, including those encoding molecules of the SNARE complex may affect mood regulation and should be triggered to develop new therapeutic strategies.

Supplementary Table 1. Missense variations identified in patients with bipolar disorder

Missense variations	Genome position ^a	Gene position ^b	rs ID ^b	Prediction softwares			FFN511 release			Serotonin uptake		
				PolyPhen2 (score)	SIFT	PROVEAN (score)	Mean (RFU/mg prot.)	SD	P value	Mean (CPM/mg prot.)	SD	P value
Mock	NA	NA	NA	NA	NA	NA	527.22	202.78	< 0.0001	3559.26	1231.18	0.0003
CADPS	chr3:62,384,021-62,861,064	NA	NA	NA	NA	NA	820.13	261.62	NA	5352.61	953.49	NA
p.I148_E185del	chr3:62,751,546-62,751,659	Exon 2	-	NA	NA	deleterious (-152.51)	434.23	48.30	0.0015	6221.31	1563.07	0.17
p.R195L	chr3:62,739,420	Exon 3	rs748288278	possibly damaging (0.83)	damaging	deleterious (-4.10)	531.02	139.89	0.14	3916.70	1408.08	0.008
p.N205K	chr3:62,739,389	Exon 3	-	possibly damaging (0.68)	tolerated	deleterious (-2.64)	501.53	172.11	0.78	4353.96	1420.43	0.05
p.S399L	chr3:62,636,529	Exon 5	rs141787208	benign (0.08)	damaging	deleterious (-2.50)	568.64	154.57	0.27	5242.94	1301.65	0.79
p.L482I	chr3:62,570,993	Exon 8	rs370794609	probably damaging (1.00)	tolerated	neutral (-1.20)	699.54	85.70	0.53	4351.20	749.12	0.01
p.R959L	chr3:62,477,973	Exon 20	-	possibly damaging (0.91)	tolerated	deleterious (-5.21)	635.92	171.85	0.27	4639.13	1201.12	0.12
p.N1017I	chr3:62,467,521	Exon 22	rs77008736	possibly damaging (0.86)	damaging	neutral (-0.97)	976.87	202.99	0.003	6049.31	1547.43	0.37
p.L482I_N1017I	NA	Exons 8 and 22	NA	NA	NA	NA	771.42	181.56	0.001	5271.99	1010.87	0.86

a, Hg19; b, NM_003716.3; NA, not applicable



Supplementary Figure S1. Rare mutation frequency in 132 patients with early-onset BD (red), 184 unaffected controls (green) and 4,600 subjects from the exome variant server database (yellow) (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>).

Only rare variations with allele frequency lower than 1‰ were considered for EVS. Missense variations (filled bars) were 3 times higher in patients with early-onset BD than in unaffected individuals (Fisher's exact test, OR=3.53, 95%CI[0.57;37.32], $p=0.13$) and 5 times higher than in the European population of EVS (Fisher's exact test, OR=5.01, 95%CI[1.51;13.06], $p=0.005$). No significant difference was observed for synonymous substitutions (opened bars) between the three populations.

Acknowledgments

This work was supported by the Investissements d'Avenir program managed by the Agence Nationale pour la Recherche (ANR) under reference ANR-11-IDEX-0004-02 (Labex BioPsy). This work also received financial support from the Institut National pour la Santé et la Recherche Médicale (Inserm), the Réseau Thématique de Recherche et de Soins en Santé Mentale (Fondation FondaMental®, Prix Marcel Dassault to SJ) and the Domaine d'Intérêt Majeur (DIM) Cerveau et Pensée to JS. The Jamain team is affiliated with the Paris School of Neuroscience (ENP) and the Bio-Psy Laboratory of Excellence.

We are very grateful to patients with bipolar disorder, their family and control subjects for their participation.

We acknowledge Dr. Nicolas Petrancosta for FFN511.

We thank E. Abadie, the Cochin Hospital cell library (Prof. J. Chelly), the Clinical Investigation Centre (Dr. P. Lecorvoisier) and the Biological Resources Platform (Prof. B. Ghaleh) of Mondor Hospital for technical assistance.

Conflict of interest

The authors have no conflict of interest.

References

1. Leboyer M, Kupfer DJ. Bipolar disorder: new perspectives in health care and prevention. *J Clin Psychiatry* 2010; **71**: 1689-1695.
2. Kieseppa T, Partonen T, Haukka J, Kaprio J, Lonnqvist J. High concordance of bipolar I disorder in a nationwide sample of twins. *The American journal of psychiatry* 2004; **161**: 1814-1821.
3. Mathieu F, Dizier MH, Etain B, Jamain S, Rietschel M, Maier W *et al.* European collaborative study of early-onset bipolar disorder: Evidence for genetic heterogeneity on 2q14 according to age at onset. *American journal of medical genetics Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics* 2010; **153B**: 1425-1433.
4. Lopez de Lara C, Jaitovich-Groisman I, Cruceanu C, Mamdani F, Lebel V, Yerko V *et al.* Implication of synapse-related genes in bipolar disorder by linkage and gene expression analyses. *The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum* 2010; **13**: 1397-1410.
5. Etain B, Mathieu F, Rietschel M, Maier W, Albus M, McKeon P *et al.* Genome-wide scan for genes involved in bipolar affective disorder in 70 European families ascertained through a bipolar type I early-onset proband: supportive evidence for linkage at 3p14. *Molecular psychiatry* 2006; **11**: 685-694.
6. Breen G, Lewis CM, Vassos E, Pergadia ML, Blackwood DH, Boomsma DI *et al.* Replication of association of 3p21.1 with susceptibility to bipolar disorder but not major depression. *Nature genetics* 2011; **43**: 3-5; author reply 5.
7. Chen DT, Jiang X, Akula N, Shugart YY, Wendland JR, Steele CJ *et al.* Genome-wide association study meta-analysis of European and Asian-

- ancestry samples identifies three novel loci associated with bipolar disorder. *Molecular psychiatry* 2013; **18**: 195-205.
8. McMahon FJ, Akula N, Schulze TG, Muglia P, Tozzi F, Detera-Wadleigh SD *et al.* Meta-analysis of genome-wide association data identifies a risk locus for major mood disorders on 3p21.1. *Nature genetics* 2010; **42**: 128-131.
 9. Psychiatric GCBDWG. Large-scale genome-wide association analysis of bipolar disorder identifies a new susceptibility locus near ODZ4. *Nature genetics* 2011; **43**: 977-983.
 10. Scott LJ, Muglia P, Kong XQ, Guan W, Flickinger M, Upmanyu R *et al.* Genome-wide association and meta-analysis of bipolar disorder in individuals of European ancestry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009; **106**: 7501-7506.
 11. He K, Wang Q, Chen J, Li T, Li Z, Li W *et al.* ITIH family genes confer risk to schizophrenia and major depressive disorder in the Han Chinese population. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 2014; **51**: 34-38.
 12. Ament SA, Szelinger S, Glusman G, Ashworth J, Hou L, Akula N *et al.* Rare variants in neuronal excitability genes influence risk for bipolar disorder. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2015; **112**: 3576-3581.
 13. Cupertino RB, Kappel DB, Bandeira CE, Schuch JB, da Silva BS, Muller D *et al.* SNARE complex in developmental psychiatry: neurotransmitter exocytosis and beyond. *Journal of neural transmission* 2016; **123**: 867-883.

14. Etain B, Dumaine A, Mathieu F, Chevalier F, Henry C, Kahn JP *et al.* A SNAP25 promoter variant is associated with early-onset bipolar disorder and a high expression level in brain. *Molecular psychiatry* 2010; **15**: 748-755.
15. Mertens J, Wang QW, Kim Y, Yu DX, Pham S, Yang B *et al.* Differential responses to lithium in hyperexcitable neurons from patients with bipolar disorder. *Nature* 2015; **527**: 95-99.
16. Sudhof TC. Neurotransmitter release: the last millisecond in the life of a synaptic vesicle. *Neuron* 2013; **80**: 675-690.
17. Wojcik SM, Brose N. Regulation of membrane fusion in synaptic excitation-secretion coupling: speed and accuracy matter. *Neuron* 2007; **55**: 11-24.
18. Ferreira MA, O'Donovan MC, Meng YA, Jones IR, Ruderfer DM, Jones L *et al.* Collaborative genome-wide association analysis supports a role for ANK3 and CACNA1C in bipolar disorder. *Nature genetics* 2008; **40**: 1056-1058.
19. Walent JH, Porter BW, Martin TF. A novel 145 kd brain cytosolic protein reconstitutes Ca(2+)-regulated secretion in permeable neuroendocrine cells. *Cell* 1992; **70**: 765-775.
20. Berwin B, Floor E, Martin TF. CAPS (mammalian UNC-31) protein localizes to membranes involved in dense-core vesicle exocytosis. *Neuron* 1998; **21**: 137-145.
21. Jockusch WJ, Speidel D, Sigler A, Sorensen JB, Varoqueaux F, Rhee JS *et al.* CAPS-1 and CAPS-2 are essential synaptic vesicle priming proteins. *Cell* 2007; **131**: 796-808.
22. Renden R, Berwin B, Davis W, Ann K, Chin CT, Kreber R *et al.* Drosophila CAPS is an essential gene that regulates dense-core vesicle release and synaptic vesicle fusion. *Neuron* 2001; **31**: 421-437.

23. Speidel D, Bruederle CE, Enk C, Voets T, Varoqueaux F, Reim K *et al.* CAPS1 regulates catecholamine loading of large dense-core vesicles. *Neuron* 2005; **46**: 75-88.
24. Sudhof TC, Rizo J. Synaptic vesicle exocytosis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2011; **3**.
25. Daily NJ, Boswell KL, James DJ, Martin TF. Novel interactions of CAPS (Ca²⁺-dependent activator protein for secretion) with the three neuronal SNARE proteins required for vesicle fusion. *The Journal of biological chemistry* 2010; **285**: 35320-35329.
26. Fatemi SH, Earle JA, Stary JM, Lee S, Sedgewick J. Altered levels of the synaptosomal associated protein SNAP-25 in hippocampus of subjects with mood disorders and schizophrenia. *Neuroreport* 2001; **12**: 3257-3262.
27. Scarr E, Gray L, Keriakous D, Robinson PJ, Dean B. Increased levels of SNAP-25 and synaptophysin in the dorsolateral prefrontal cortex in bipolar I disorder. *Bipolar disorders* 2006; **8**: 133-143.
28. Brunk I, Blex C, Speidel D, Brose N, Ahnert-Hilger G. Ca²⁺-dependent activator proteins of secretion promote vesicular monoamine uptake. *The Journal of biological chemistry* 2009; **284**: 1050-1056.
29. Liu Y, Schirra C, Stevens DR, Matti U, Speidel D, Hof D *et al.* CAPS facilitates filling of the rapidly releasable pool of large dense-core vesicles. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2008; **28**: 5594-5601.
30. Grishanin RN, Klenchin VA, Loyet KM, Kowalchuk JA, Ann K, Martin TF. Membrane association domains in Ca²⁺-dependent activator protein for secretion mediate plasma membrane and dense-core vesicle binding required

- for Ca²⁺-dependent exocytosis. *The Journal of biological chemistry* 2002; **277**: 22025-22034.
31. Grishanin RN, Kowalchyk JA, Klenchin VA, Ann K, Earles CA, Chapman ER *et al.* CAPS acts at a pre-fusion step in dense-core vesicle exocytosis as a PIP2 binding protein. *Neuron* 2004; **43**: 551-562.
 32. Koch H, Hofmann K, Brose N. Definition of Munc13-homology-domains and characterization of a novel ubiquitously expressed Munc13 isoform. *The Biochemical journal* 2000; **349**: 247-253.
 33. Khodthong C, Kabachinski G, James DJ, Martin TF. Munc13 homology domain-1 in CAPS/UNC31 mediates SNARE binding required for priming vesicle exocytosis. *Cell metabolism* 2011; **14**: 254-263.
 34. Nurnberger JI, Jr., Blehar MC, Kaufmann CA, York-Cooler C, Simpson SG, Harkavy-Friedman J *et al.* Diagnostic interview for genetic studies. Rationale, unique features, and training. NIMH Genetics Initiative. *Archives of general psychiatry* 1994; **51**: 849-859; discussion 863-844.
 35. American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. 4th edn. American Psychiatric Press: Washington, DC, 1994.
 36. Bellivier F, Etain B, Malafosse A, Henry C, Kahn JP, Elgrabli-Wajsbrodt O *et al.* Age at onset in bipolar I affective disorder in the USA and Europe. *The world journal of biological psychiatry : the official journal of the World Federation of Societies of Biological Psychiatry* 2014; **15**: 369-376.
 37. Jamain S, Cichon S, Etain B, Muhleisen TW, Georgi A, Zidane N *et al.* Common and rare variant analysis in early-onset bipolar disorder vulnerability. *PloS one* 2014; **9**: e104326.

38. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D *et al.* PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *American journal of human genetics* 2007; **81**: 559-575.
39. Takahashi M, Matsuda F, Margetic N, Lathrop M. Automated identification of single nucleotide polymorphisms from sequencing data. *Journal of bioinformatics and computational biology* 2003; **1**: 253-265.
40. Gubernator NG, Zhang H, Staal RG, Mosharov EV, Pereira DB, Yue M *et al.* Fluorescent false neurotransmitters visualize dopamine release from individual presynaptic terminals. *Science* 2009; **324**: 1441-1444.
41. Brunk I, Blex C, Rachakonda S, Holtje M, Winter S, Pahner I *et al.* The first luminal domain of vesicular monoamine transporters mediates G-protein-dependent regulation of transmitter uptake. *The Journal of biological chemistry* 2006; **281**: 33373-33385.
42. Stevens DR, Rettig J. The Ca(2+)-dependent activator protein for secretion CAPS: do I dock or do I prime? *Molecular neurobiology* 2009; **39**: 62-72.
43. Grigoriou-Serbanescu M, Martinez M, Nothen MM, Grinberg M, Sima D, Propping P *et al.* Different familial transmission patterns in bipolar I disorder with onset before and after age 25. *American journal of medical genetics* 2001; **105**: 765-773.
44. Leboyer M, Bellivier F, McKeon P, Albus M, Borrmann M, Perez-Diaz F *et al.* Age at onset and gender resemblance in bipolar siblings. *Psychiatry research* 1998; **81**: 125-131.
45. Leboyer M, Henry C, Paillere-Martinot ML, Bellivier F. Age at onset in bipolar affective disorders: a review. *Bipolar disorders* 2005; **7**: 111-118.

46. Lin PI, McInnis MG, Potash JB, Willour V, MacKinnon DF, DePaulo JR *et al.* Clinical correlates and familial aggregation of age at onset in bipolar disorder. *The American journal of psychiatry* 2006; **163**: 240-246.
47. O'Mahony E, Corvin A, O'Connell R, Comerford C, Larsen B, Jones R *et al.* Sibling pairs with affective disorders: resemblance of demographic and clinical features. *Psychological medicine* 2002; **32**: 55-61.
48. Schurhoff F, Bellivier F, Jouvent R, Mouren-Simeoni MC, Bouvard M, Allilaire JF *et al.* Early and late onset bipolar disorders: two different forms of manic-depressive illness? *Journal of affective disorders* 2000; **58**: 215-221.
49. Kennedy KP, Cullen KR, DeYoung CG, Klimes-Dougan B. The genetics of early-onset bipolar disorder: A systematic review. *Journal of affective disorders* 2015; **184**: 1-12.
50. Nguyen Truong CQ, Nestvogel D, Ratai O, Schirra C, Stevens DR, Brose N *et al.* Secretory vesicle priming by CAPS is independent of its SNARE-binding MUN domain. *Cell reports* 2014; **9**: 902-909.
51. Chen HM, DeLong CJ, Bame M, Rajapakse I, Herron TJ, McInnis MG *et al.* Transcripts involved in calcium signaling and telencephalic neuronal fate are altered in induced pluripotent stem cells from bipolar disorder patients. *Translational psychiatry* 2014; **4**: e375.
52. Wang JL, Shamah SM, Sun AX, Waldman ID, Haggarty SJ, Perlis RH. Label-free, live optical imaging of reprogrammed bipolar disorder patient-derived cells reveals a functional correlate of lithium responsiveness. *Translational psychiatry* 2014; **4**: e428.
53. Machado-Vieira R, Soeiro-De-Souza MG, Richards EM, Teixeira AL, Zarate CA, Jr. Multiple levels of impaired neural plasticity and cellular resilience in

- bipolar disorder: developing treatments using an integrated translational approach. *The world journal of biological psychiatry : the official journal of the World Federation of Societies of Biological Psychiatry* 2014; **15**: 84-95.
54. Anand A, Koller DL, Lawson WB, Gershon ES, Nurnberger JI, Bi GSC. Genetic and childhood trauma interaction effect on age of onset in bipolar disorder: An exploratory analysis. *Journal of affective disorders* 2015; **179**: 1-5.
55. Viswanath B, Jose SP, Squassina A, Thirthalli J, Purushottam M, Mukherjee O *et al*. Cellular models to study bipolar disorder: A systematic review. *Journal of affective disorders* 2015; **184**: 36-50.
56. Manji HK, Quiroz JA, Payne JL, Singh J, Lopes BP, Viegas JS *et al*. The underlying neurobiology of bipolar disorder. *World psychiatry : official journal of the World Psychiatric Association* 2003; **2**: 136-146.

Discussion partielle sur les conséquences fonctionnelles des mutations dans le gène *CADPS* identifiées chez des patients avec des formes à début précoce de troubles bipolaires

Etude de répliation de l'association génétique dans CADPS.

L'étude d'association génétique que nous avons réalisée doit être répliquée sur une cohorte indépendante. Pour cela plusieurs options sont envisageables dont la comparaison de nos résultats avec ceux obtenus par le *Psychiatric Genomic Consortium (PGC)*. Les données de GWAS du PGC n'ont pas génotypé le rs35462732, malgré tout on note que pour l'ensemble des maladies psychiatriques il existe un SNP dans *CADPS* associé avec la maladie, mais pas à l'échelle du génome (Tableau II. 1). Pour s'affranchir de ce manque de données, on a donc regardé les SNP qui étaient en déséquilibre de liaison avec le rs35462732. Dans le projet 1000 génomes, 10 SNP sont en déséquilibre de liaison avec notre SNP d'intérêt ($r^2 > 0.3$) (Figure II. 1). Parmi les SNP liés aux rs35462732, il y a le rs2367089 qui est le plus associé lors du GWAS réalisé par le PGC sur des patients atteints de troubles de l'attention et de l'hyperactivité (TDAH, annexe II) dans le gène *CADPS* ($P=0,0016$) (Figure II. 1). On peut supposer, que nos résultats montrant une association génétique avec le rs35462732 dans *CADPS* qui s'avère d'autant plus conséquente lorsque les patients déclarent leur premier épisode thymique avant 21 ans, peut être lié ou confondu avec des troubles de l'attention et de l'hyperactivité. En effet, d'un point de vue clinique, les enfants et adolescents souffrant de ces deux pathologies partagent une symptomatologie très chevauchante, sous jacente à une perturbation neurobiologique commune (Zepf 2009).

Etude des données cliniques des patients recrutés.

Les patients avec un trouble bipolaire à début précoce recrutés dans les *Centres experts du réseau Fondamental* dans le cadre de notre criblage génétique, a eu lieu il y a plus de dix ans. Ainsi, le manque de données cliniques et génétiques ne nous permet pas de recontacter les patients ou d'explorer finement les caractéristiques cliniques de ceux porteur des mutations non-synonymes dans le gène *CADPS*. C'est pourquoi la perspective de produire des neurones issus de cellules induites à la pluripotence ne semble pas envisageable.

Malgré tout, on peut tout de même noter que l'ensemble des patients étudiés présentait des comorbidités et beaucoup d'épisodes thymiques (Figure II. 2). Parmi les comorbidités retrouvées, cinq patients sur six évalués présentent des troubles anxieux dont des attaques paniques (PA), des phobies sociales (SAD, SP) ou des troubles anxieux généralisés (GAD). Parallèlement, on observe chez les souris privées d'une copie de *Cadps* (*Caps^{+/-}*) un phénotype anxieux avec une réponse au stress mal régulée. Ainsi, on peut penser que ce gène interviendrait spécifiquement dans la réception d'évènements stressant pour produire des émotions adaptées.

De plus, les données familiales nous informent que pour cinq patients portant les mutations dans *CADPS* sur sept familles connues, au moins un membre de la famille nucléaire est atteint d'un trouble psychiatrique, pour les deux restantes le statut des apparentés n'est pas déterminé (Figure II. 2). Ces observations cliniques nous permettent de justifier l'étude de cet endophénotype car elles valident le caractère héréditaire de ces maladies psychiatriques mais aussi la sévérité des phénotypes observés.

Etude nosographique par le biais de la génétique.

La tentative de classer les pathologies psychiatriques dans le but de mieux les diagnostiquer et mieux les traiter, s'avère complexe et en perpétuel changement. En effet, aujourd'hui la distinction entre une schizophrénie et un trouble bipolaire est remise en cause et la nosographie serait à l'image d'un continuum clinique où seul des cas extrêmes rempliraient exclusivement des critères de schizophrénie ou de trouble bipolaire. D'un point de vue génétique, les données épidémiologiques de *Lichtenstein et al.*, confirment cette hypothèse puisqu'il observe que 40% de la part génétique du trouble bipolaire serait en commun avec la schizophrénie. Dans le but de discriminer ou confirmer cette hypothèse, nous allons pouvoir vérifier ces taux de mutations identifiés dans le gène *CADPS*, grâce à des données d'exomes obtenues par séquençage à haut débit dans une cohorte de 200 patients avec un trouble bipolaire, 200 schizophrènes et 200 témoins.

Réplication des résultats sur un autre modèle cellulaire.

Les techniques que nous avons mises au point dans le but de caractériser les mutations identifiées chez les patients ont été réalisées dans un modèle de surexpression génique transitoire par transfection ou électrolocation. Cet outil ne permet pas de contrôler finement les taux d'expression protéique intercellulaires dans une culture hétérogène. Par soucis de robustesse, nous avons décidé de produire des lignées de cellules PC-12 infectées par des lentivirus dans le but d'exprimer de manière constitutive les différentes mutations identifiées dans le gène *CADPS*. Celles-ci pourront permettre de répliquer les précédant résultats obtenus. (Figure II. 3)

Résultats préliminaires sur des modèles intégrés.

Les résultats électrophysiologiques obtenus à partir de cultures de neurones d'hippocampe de souris privées du gène *Caps*, nous ont permis de montrer que la délétion de l'exon 2 de ce gène conduisait à une probabilité de libération en neurotransmetteurs plus forte et une dépression à court terme du neurone post-synaptique plus intense après l'application de plusieurs trains de potentiels d'action. C'est pourquoi, le laboratoire du Pr. Nils Brose a décidé de générer une souris transgénique privée de l'exon 2 de *Cadps* par la technologie du CRISPR/Cas9 pour étudier directement son phénotype. Les résultats préliminaires confirment ceux obtenus par infection lentivirale, mais demandent à être confirmés.

D'autre part, en collaboration avec le laboratoire du Pr. Thomas Martin à l'université du Wisconsin nous avons voulu tester la fonction de la protéine CADPS en présence des mutations retrouvées dans notre cohorte de patients, dans un modèle de cellules PC-12 perméabilisées pour suivre l'exocytose de catécholamines grâce à un radio-marquage dopaminergique ou par voltamétrie. Les résultats préliminaires montrent que deux mutations R195L et L482I (les deux retrouvées lors de notre mesure du chargement vésiculaire) altèrent drastiquement la fonction de CADPS comparée à sa forme sauvage.

Tableau II. 1. Liste des différents SNP localisés dans le gène *CADPS*, associés dans les différentes maladies psychiatriques lors des GWAS réalisés par le PGC.

Le site web du Broad Institute, Ricopili (<https://www.broadinstitute.org/mpg/ricopili/>) est une plateforme qui nous permet de visualiser une région d'intérêt dans les GWAS réalisées par le PGC pour les différentes maladies psychiatriques. Il existe un SNP dans *CADPS* associé (pas à l'échelle du génome) à chacune des maladies psychiatriques testées.

Psychiatric Genetic Consortium diseases	SNP ID	Genomic position (bp)	P value	OR
Schizophrenia (M. L. Hamshere et al. 2013)	rs10454776	62 810 247	0.0002	0.92219
Bipolar disorder (Group 2011)	rs833638	62 595 403	0.004	1.0900
Majour depressive disorder (Ripke et al. 2013)	rs7646021	62 508 933	0.005	1.085
Attention Deficit and Hyperactivity disorder (Neale et al. 2010)	rs2367089	62 491 115	0.002	-3.144
Cross Disorder Analysis (Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics Consortium 2013)	rs11716318	62 414 654	0.0008	1.056

RS Number	Coord	Alleles	MAF	Distance	Dprime	R2
rs35462732	chr3:62474494	(G/T)	0.0952	0	1.0	1.0
rs7635279	chr3:62473481	(A/T)	0.1308	-1013	0.9108	0.5803
rs9850523	chr3:62474299	(T/C)	0.1701	-195	0.9975	0.5109
rs2367089	chr3:62476790	(G/A)	0.1789	2296	0.9872	0.4709
rs7631150	chr3:62475455	(T/G)	0.1853	961	1.0	0.4628
rs7641287	chr3:62475351	(A/G)	0.1855	857	1.0	0.4622
rs9867870	chr3:62474171	(A/T)	0.1573	-323	0.8408	0.3985
rs9852260	chr3:62471390	(A/G)	0.1012	-3104	0.6198	0.359
rs72891922	chr3:62479618	(A/G)	0.0431	5124	0.8823	0.3333
rs9873853	chr3:62468124	(G/A)	0.0952	-6370	0.5574	0.3107
rs72887747	chr3:62457709	(C/T)	0.0383	-16785	0.8906	0.3004

Figure II. 1. Résultat de la liaison génétique entre notre SNP associé avec le TBP (rs35462732) et celui du PGC pour l'ADHD (rs2367089).

Le site web LDlink (<http://analysistools.nci.nih.gov/LDlink/>) nous permet d'interroger les différents SNP genotypés lors du projet 1000 génomes les plus fortement liés à notre SNP d'intérêt (rs35462732), dans une population européenne. Le tableau référence la liste des 10 polymorphismes les plus liés à notre polymorphisme d'intérêt, avec leurs positions génomiques (Coord), les variants alléliques (Alleles), les fréquences de variations (MAF), les distances physiques entre les deux polymorphismes (Distance) et les valeurs de D' et de R². Parmi eux le SNP retrouvé dans le PGC associé à l'ADHD dans *CADPS* (rs2367089, 4ème ligne du tableau) est lié avec notre SNP d'intérêt (R²=0,47), dans la population européenne.

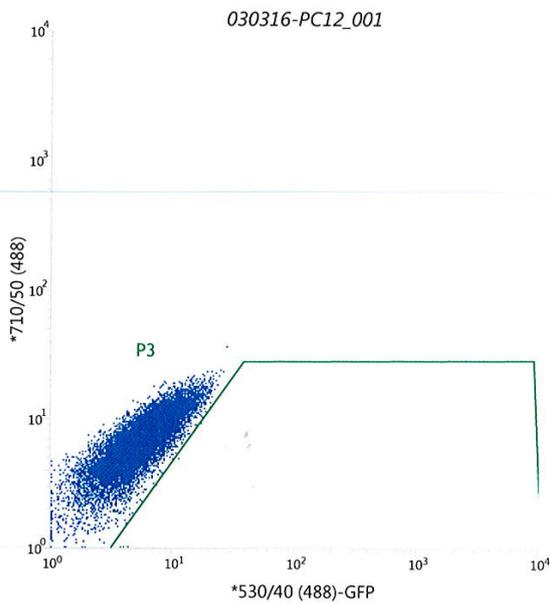
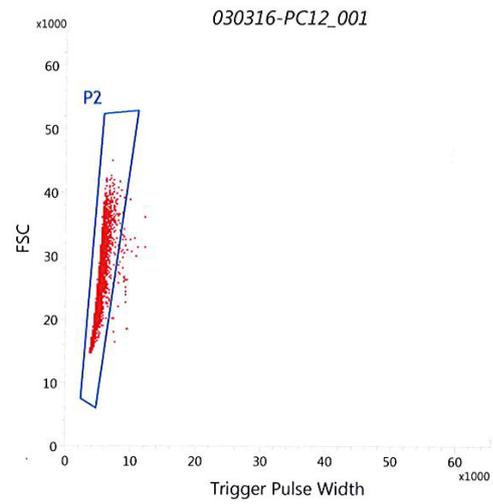
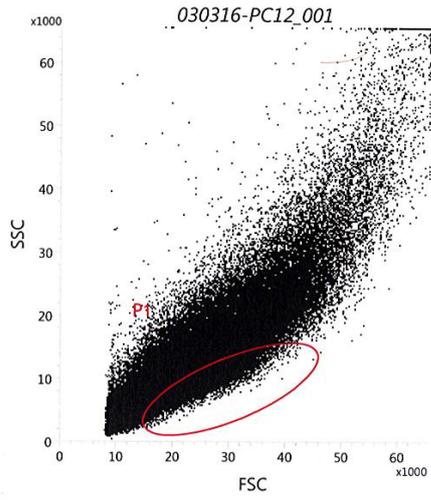
Mutation	Genre	Family relationship with propositant	Age at onset 1st symptom	Number of episodes *	Rapid cycle	Suicidal attempt (SA)	Treatment	Psychotic episode*	Comorbidities	Anxiety disorder**	Addiction	abuse	Eating disorder	Somatic disease	Evaluation	Observation
Exon 2 deletion	F	proposant	28	1M	no	0	-	1M	1	PA	0					at 28 years old
	M	father					Lithium								0	
	F	mother													0	
	M	germain				1									0	dead from SA
R195L	F	proposant	14	Lot of D + 3M+ lot of ME	yes	6	-	0M	2	SAD (13 years)	0		bulimia (14 years)			
	M	germain	15	-	-	yes	-	-			alcohol+cannabis					not evaluated
N205K	F	proposant	15	7D+1M+ME	no	3	Tegretol	5D+1M	2	PA (45 years)		alcohol		allergies		
	M	germain	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
S399L	F	proposant	16	2D + 5M + ME	no	0	-	2D+5M	1	0	cannabis	alcohol		migraines from 12 years old 1996		
	F	germain	17	3D	no	0	-	1D	1	0	-	alcohol+cannabis		0		
	F	mother	34	at least 2D	-	0	-	-	0	0	0	0		0		
	M	père	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-		0		seen in 97
R959L	M	proposant	17	5D	no	3	-	0	1	GAD (22 years)	0	0		no		
	F	germain														
	M	germain														
	M	germain														
	F	father														dead
L482I&N1017I	F	proposant	11	4D+1M+ME	yes	?	-	0	2	SP		alcohol+cannabis		asthma (15 years)		finnish family
	M	father														
	F	mother												dyslexia+ asthma (20 years)		
	F	1/2 germain	14	2D+3M+ME	no	0	-	1M	0	0	0			0		
	F	mother of 4							0	0	0			0		
F	1/2 germain							0	0	0			0			

* M for manic episodes, D for depression, ME for mixte episodes

** SAD for social anxiety disorder, PA for panic attack, GAD for generalized anxiety disorder, SP for social phobia

Tableau II. 2. Etude clinique des familles de patients sélectionnés avec les mutations dans le gène *CADPS*. Evaluation clinique des différents membres de la famille nucléaire pour 6 patients avec un TBDP portant les mutations non-synonymes dans *CADPS*.

a



Populations: 030316-PC12_001

Populations	Even...	% Total	% Parent
All Events	100,000	100.00%	###
P1	17,568	17.57%	17.57%
P2	17,526	17.53%	99.76%
P3	12	0.01%	0.07%

b

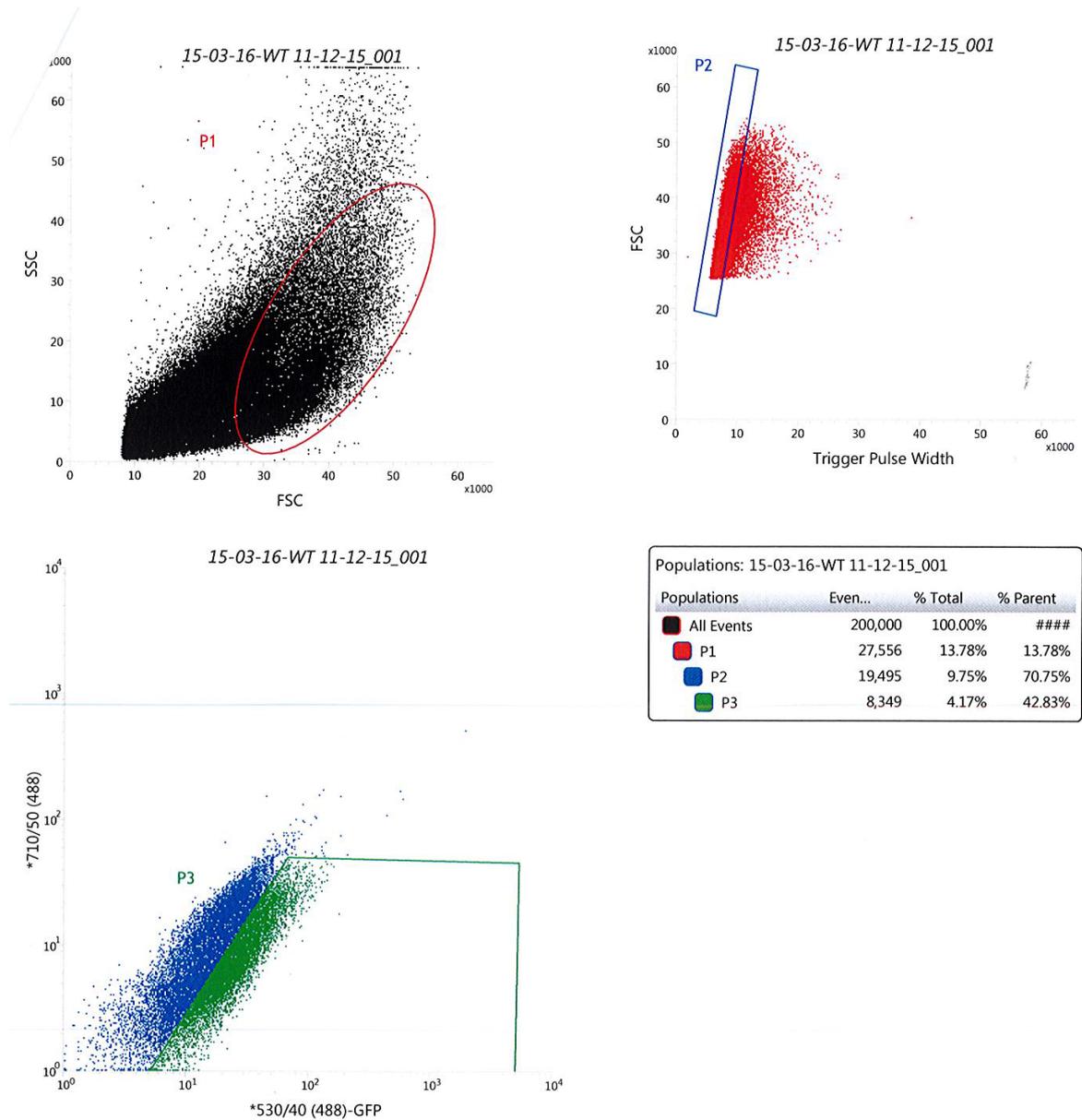


Figure II. 2. Tri sur la GFP de cellules PC-12 infectées par un vecteur lentiviral (pF(syn)W-RBN-CADPS-eGFP) contenant les différentes isoformes du gène CADPS
 (a) Représentation par le logiciel MoFlow du contrôle négatif des cellules PC-12 non infectées pour fixer les paramètres de tri. Les cellules triées sont vivantes (P1), en singulet (P2) et fluorescent à 488nm (P3).

(b) Exemple de tri sur le BD Influx (BD Bioscience) de cellules PC-12 infectées par la forme sauvage de *CADPS* pour l'obtention de lignées stables de cellules PC-12 contenant les différentes isoformes mutantes de *CADPS*. Ici on a trié, 4,17 % de l'ensemble de l'échantillon contenant des cellules vivantes (P1), en singulets (P2) et qui fluorescent à 488 nm, car le vecteur insérée est suivie grâce à la GFP.

2. La caractérisation de la souris *Caps1^{+/-}* peut nous aiguiller sur la physiopathologie du trouble bipolaire

Nous avons précédemment montré que des mutations dans le gène *CADPS* identifiées chez des patients avec un trouble bipolaire à début précoce, modifiaient sa fonction *in vitro*. Dans un modèle intégré nous avons voulu caractériser le modèle de souris privées d'un allèle de *Cadps* (*Caps1^{+/-}*) pour confirmer notre hypothèse *in vivo* et apporter des informations en lien avec l'environnement, pour tenter de placer cette protéine dans un mécanisme physiopathologique lié au stress.

Dans ce but, nous avons tout d'abord observé l'activité locomotrice totale de nos souris hétérozygotes comparées à des souris sauvages. Celles-ci sont légèrement plus actives durant la nuit que les souris sauvages pendant les sept jours de test, particulièrement durant la première heure du cycle nocturne (One-way ANOVA, genotype effect, $F(1,220)=4.235$, $P=0.0408$). De plus, nous avons regardé ce même paramètre dans un environnement stressant pour la souris, comme l'open-field. Nous observons que les souris hétérozygotes parcourent significativement plus de distance que les souris sauvages dans ce nouvel environnement (One-way ANOVA, genotype effect, $F(1,288)=11.65$, $P=0.0007$).

Les troubles anxieux sont l'une des principales comorbidités rencontrées chez des patients souffrant de trouble bipolaire. C'est pourquoi nous avons tenté d'évaluer l'anxiété des souris hétérozygotes comparées aux sauvages grâce à des tests de comportements spécifiques. Ainsi, nous avons identifié que les souris hétérozygotes mettaient plus de temps à enfouir des objets nouveaux présent dans leurs cages (One-way ANOVA, genotype effect, $F(1,21.36)=4.396$, $P<0.0377$) ainsi qu'à se rendre dans un compartiment anxiogène éclairé que les souris sauvages mais pas de manière significative.

Cependant, quand nous interrogeons les comportements liés à la dépression par le biais de tests de renoncement, nous observons que les souris hétérozygotes sont moins sensibles à des tests de désespoir que les souris sauvages, comme la nage forcée où celles-ci nagent plus longtemps que les sauvages (unpaired t test $t(20)=2.258$, $P=0.0352$) ou le test de suspension par la queue où celles-ci renoncent moins vite à (unpaired t test, $t(16)=2.332$, $P=0.0331$). De plus, en regard de la symptomatologie liée à la dépression, nous avons voulu tester l'anhédonie ou les conduites alimentaires chez ces souris. Nous observons que les souris *Caps1^{+/-}* ne sont pas anhédonique quand il

s'agit d'une préférence à l'eau sucrée ou encore que leurs prises alimentaire ne diffèrent pas de celles des souris sauvages durant les sept jours de test.

Enfin, dans le but de spécifier notre modèle murin pour une pathologie psychiatrique, nous avons testé un aspect cognitif associé à la schizophrénie comme le réflexe de sursaut acoustique ou l'inhibition de sursaut suite à un signal antérieur. Nous observons que les souris hétérozygotes ne diffèrent pas des souris sauvages dans cette réaction mécanique réflexe basale ou dans son conditionnement à la peur.

Après avoir étudié plusieurs aspects du comportement des souris *Caps1^{+/-}* dans des conditions basales, nous avons voulu regarder leurs comportements et l'expression de neuro-hormones en condition de stress chronique modéré. Nous avons dès-lors retester l'activité locomotrice dans un openfield pour des souris hétérozygotes en comparaison avec les souris sauvages. De manière générale, nous confirmons à l'âge adulte que les souris hétérozygotes parcourent plus de distance que les souris sauvages. Alors que ayant subi le stress chronique, cette différence est moins marquée (Two-way ANOVA, genotype effect, $F(1,52411)=6.431$, $P=0.0123$) mais semble maintenue dans la zone anxiogène (Two-way ANOVA, genotype effect, $F(3,5670)=5.019$, $P=0.021$). De même pour le marble burying test où la différence de vitesse d'enfouissement est maintenue chez les adultes (Two-way ANOVA, genotype effect, $F(1,252.3)=39.63$, $P<0.0001$), alors que le stress chronique permet de réduire cette différence entre les deux génotypes (Two-way ANOVA, genotype effect, $F(1,8.412)=1.698$, $P=0.1938$).

Pour affiner moléculairement l'impact du stress sur ces souris, nous avons décidé d'étudier sa régulation en dosant le cortisol plasmatique, le facteur neurotrophique BDNF hippocampique et l'expression corticale de protéines du complexe SNARE. Dans le temps, la sécrétion de cortisol est corrélée à l'intervention d'un stress. Ainsi, nous avons suivi la cinétique du cortisol plasmatique suite à l'application d'un stress aigu puis son rétablissement. Nous observons que les souris hétérozygotes ayant subi le stress chronique continuaient à augmenter leur taux de cortisol trente minutes après l'application du stress aigu alors que les trois autres groupes de souris commençaient à diminuer leur niveau plasmatique (Two-way ANOVA, genotype effect, statut effect, $F(3,87)=8.901$, $P<0.0001$). De manière intéressante le facteur neurotrophique BDNF hippocampal est aussi augmenté après l'application du stress chronique chez les souris hétérozygotes comparées aux sauvages stressées (uncorrected Fisher's LSD, genotype effect, $t(25)=2.497$, $P=0.0195$). Enfin, l'expression protéique de SNAP25 dans le cortex

des souris hétérozygotes ayant subi le stress chronique est aussi fortement diminué comparées aux sauvages (uncorrected Fisher's LSD, $P < 0.05$).

ARTICLE 2

Jérémy Sitbon^{1,2,3}, Caroline Kappeler^{1,2,3,4}, Rejane Troudet^{1,2,3}, Jeong Seop Rhee⁶, Marion Leboyer^{1,2,3,5}, Marika Nosten-Bertrand⁴ and Stéphane Jamain^{1,2,3,*} *Caps1*^{+/-} mice characterization is related to stress response dysregulation involved in bipolar disorder

***Caps1*^{+/-} mice characterization is related to stress response dysregulation involved in bipolar disorder**

Jérémy Sitbon^{1,2,3}, Caroline Kappeler^{1,2,3,4}, Rejane Troudet^{1,2,3}, Jeong Seop Rhee⁶, Marion Leboyer^{1,2,3,5}, Marika Nosten-Bertrand⁴ and Stéphane Jamain^{1,2,3,*}

¹ *INSERM U955, Psychiatrie Translationnelle, Créteil, France;*

² *Université Paris Est, Faculté de Médecine, Créteil, France;*

³ *Fondation FondaMental, Créteil, France;*

⁴ *INSERM UMR-S839, Développement cortical et pathologie, Paris, France;*

⁵ *AP-HP, Hôpital H. Mondor – A. Chenevier, Pôle de Psychiatrie, Créteil, France*

⁶ *Department of Molecular Neurobiology, Max Planck Institute of Experimental Medicine, Göttingen, Germany*

*Corresponding authors:

Dr Stéphane Jamain

Inserm U955, Psychiatrie Translationnelle

Faculté de Médecine, 8 rue du Général Sarrail, Créteil, 94000, France.

Phone: +33 1 49 81 37 75

Fax: +33 1 49 81 35 88

E-mail: stephane.jamain@inserm.fr

Abstract

Calcium activator protein for secretion (CAPS-1) is an essential synaptic vesicle priming protein. Regulation of this process controls many brain functions and has been involved in neuropsychiatric disease, such as bipolar disorder (BD). We previously performed a case-control association study on early-onset BD (EOBD) patient, and revealed an association with a single nucleotide polymorphism (SNP) on the *CADPS* gene. Also, we found mutations in the *CADPS* gene that are three times higher in EOBD patients than in controls, which can altered its function.

We therefore investigated the possibility that heterozygous CAPS mice (*Caps1^{+/-}*) could be a relevant model for explaining some aspects of the manic-like symptoms of the disease. Transgenic mice showed a slight increased in general locomotor activity and anxiety related behaviors in the dark light box and marble burying test. Inversely, heterozygous mice revealed a reduced behavioral despair during the forced swim test (FST) and the tail suspension test (TST) than the wild-type littermate. To assess the stress-response, we evaluated the level of some proteins after an unpredictable chronic mild stress (UCMS) protocol. We showed that the SNARE protein SNAP25 is down regulated in the cortex of the *Caps1^{+/-}* mice as compare to the wild type. Whereas the serum cortisol level and the hippocampal brain derived neurotrophic factor (BDNF) are increased in the *Caps1^{+/-}* mice after UCMS as compare to the wild type.

Altogether, these results show that *CADPS* could be a stress-regulated protein involved in the physiopathology of BD.

Introduction

Bipolar disorder (BD) is one of the first leading causes of disability, affecting one percent of the worldwide population(1). During the past decade, genetic data highlighted the complex inheritance of this disorder in which a combination of multiple genes were associated with BD(2). This complex disease is characterized by alternating periods of mania and periods of depression(3). During manic episodes BD patients describe euphoric or irritable mood, and behavioral symptoms, including hyperactivity, aggressive behavior, increased goal-directed behavior, and substance abuse. In contrast, episodes of depression are characterized by depressed or irritable mood accompanied by markedly diminished interest or pleasure (anhedonia) in everyday activities, psycho- motor retardation, changes in body weight or appetite, and increased renounced behavior(4). The brain is the central organ of adaptation to social and physical stressor to produce a behavioral response that could be damaging or protective. In fact, in mood disorders, like BD, stress and anxiety related disorders could be involved in the physiopathology of this disease(5)(6). For instance, people with post-traumatic stress disorder (PTSD) are more susceptible to develop a psychiatric disease, such as schizophrenia or mood disorder(7), and children with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) are often misdiagnosed for bipolar disorder due to clinical symptoms recurrence(8).

Nevertheless, physiopathology of BD remains poorly understood despite the progress in the discovery of new molecular pathways involving the monoamine, catecholamine and hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis in the burden of these disorders(9). Mental disorders such as BD involves perturbations in molecular mechanisms governing the exocytotic machinery- and thereby regulation of neurotransmitter quantity into the synaptic cleft(10)(11). Exocytosis of synaptic

vesicles (SVs) is a common mechanism between these three pathways which regulates essential brain functions, such as response to environmental stimuli to create an adaptive emotional state. This complex function is mediated by key proteins including the SNAREs complex, Rab proteins, Sec1/Munc18-like (SM) proteins, and tethering proteins termed CATCHR (complex associated with tethering containing helical rods) proteins (12). Additional components, Ca^{2+} and ATP are required for regulated exocytosis such as the tissue-specific factor CADPS (for Ca^{2+} dependant activator protein for secretion) homologue of the UNC-31 protein required for neurosecretion in *C. elegans* (13). The CADPS protein (also known as CAPS-1) plays a major role in secretory granule exocytosis(13)(14). CAPS-1 is triggering the priming of SVs and large dense core vesicles (LDCVs) in neurons(15)(16) and neuroendocrine cells. Therefore, *in vitro* studies demonstrated that cells lacking CAPS exhibit impaired vesicles exocytosis.

We previously demonstrated that *CADPS* could be a vulnerability gene associated with early-onset form of BD (EOBD) as we found an association with a single nucleotide polymorphism with the disease, or that *CADPS* mutation screening in patient with EOBD can altere its function *in vitro*.

To confirm implication of vulnerability genes in BD, animal models developed by genetic manipulation offered the possibility to recapitulate some symptoms of the human disorder such as anxiety, affect, activity, motivation(17). Therefore, combination of neurobiology and behavioral approaches allow us to evaluate some parameters that could help us to understand the physiopathology in order to develop new-targeted treatment.

CADPS protein is essential for mice survival and expressed in several brain regions including the cerebellum, cortex, hippocampus and olfactory bulb(18)(19). In *Caps-1*

deletion mutant mice, neurons exhibit perturbations in catecholamine uptake and very few fusion competent SVs for monoamine and excitatory proteins exocytosis(15). It has been shown, very recently, that *Caps-1* knockdown in primary hippocampal neurons produce a deficit in the transmitter release of the brain derived neurotrophic factor (BDNF) from SVs(20).

In light of emerging the role of CADPS in the physiopathology of BD, we investigated the possibility that *Caps*^{+/-} heterozygous mice could be of relevance to model a particular trait of BD. In the present study, animals were tested for behavioral traits, on activity (actimetry and rearing), reactivity (startle response), affect (forced swimming and tail suspension tests, sucrose consumption) and anxiety (dark light box and marbule burying tests). Response to stress was also tested following an unpredictable chronic mild stress (UCMS) protocol where hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis activation was measured (corticosterone (CORT)) as well as plasticity (brain derived neurotrophic factor protein level (BDNF) or exocytosis machinery (SNARE protein level)).

Material and methods

Animal

All experiments were conducted in accordance with the European Communities Council Directive (86/609/EEC) regarding the housing, care, and experimental procedures on mice. Author SJ is authorized to conduct animal experiments by the Ministry of Agriculture. MNB holds an authorization to conduct animal experiments from the Direction Départementale des Services Vétérinaires.

Caps1^{+/-} hybrid heterozygous mice were provided by the Nils Brose lab. They were transferred and maintained on the C57BL/6J background (B6) and C57BL/6 littermate wild-type (WT) mice were bred and reared in-house. The animals were weaned at 4 weeks and housed two to four per cage by sex and litter regardless of the genotype under standard conditions, with food and water available *ad libitum*.

All animals were produced and genotyped as previously described(15). Genotyping of mice was performed on DNA obtained from tail tip biopsies using polymerase chain reaction (PCR) amplification. Tail biopsies were digested in 100 µl of quick tail digestion buffer containing 50mM KCl, 10mM Tris HCl (pH= 9), 0,1 % Triton X-100 and 0.4mg/ml proteinase K (ref) incubated overnight at 56°C with shaking. To stop the reaction homogenates were incubated at 100°C for 10min. *Caps1*^{+/-} genotype was determined using three primers PCR. Two primers flank the mapped insertion site and third primer is transposon specific: 5'-TATGAGGAGTTTATGTGCGTGGAT-3'; 5'-CTCGAGTGGCCTGATCTTTGTCA-3'; 5'-TGCGGTGGGCTCTATGGCTTCT-3'. For PCR genotyping we used 1µl of tail lysate, with 0.05µl (5U/µl) MyTaq DNA Polymerase (Bioline,UK), 4µl (5x) MyTaq Reaction buffer (Bioline, UK), with 94°C for 1min, 95°C for 15', 60°C for 15', 72°C for 1min during 35 cycles.

One to eleven month-old WT and *Caps1*^{+/-} heterozygous male mice were used in this study to avoid the possible influence of the menstrual cycle on fluctuations in activity. Mice were placed on quarantine before being transferred to the phenotyping area where they were acclimated before testing under controlled temperature (21-22°C) for 12-12 light-dark cycle (light on at 07 a.m.), with food and water available *ad libitum*. Testing started at four week-old and was carried out in accordance with European institutional guidelines and was approved by the local ethical committee.

Behavioral protocols

Except for the 48h locomotion activity measurement and the circadian rhythm measurement, experiments were always conducted during the light phase of a 12h light/dark schedule (lights on at 7:30 a.m, lights off at 7:30 p.m) in a sound-attenuated room under controlled illumination and by trained observers blind to the genotype.

Baseline behavioral studies were performed on 1-month-old naïve *Caps1* Hz mice or 6-months-old naïve animals and their WT counterpart littermates. To test the effect of stress on *Caps1* Hz mice behavior, behavioral studies were performed on 2-to-6 months old *Caps1* Hz mice or their WT counterpart littermates under chronic unpredictable mild stress protocol (CUMS) and 2-to-6 months old unstressed *Caps1* Hz mice or their WT counterpart littermates.

For each protocol, 2 to 4 independent experiments with different pools of mice were run. All experiments were conducted in accordance with the European Communities Council Directive (86/609/EEC) regarding the housing, care, and experimental procedures on mice (agreement B 75-05-24).

Locomotor activity

Horizontal (locomotion) and vertical (rearing) activities of animals in novel environments were measured individually in plexiglass cages (20×15×25 cm), with automatic monitoring of photocell beam breaks located at 1.5 cm (horizontal activity) and 6.5 cm (vertical activity) above the floor (Imetronic, Bordeaux, France). For horizontal activity, consecutive beam breaks were recorded from two separate photocell beams. The number of beam breaks in this case can be correlated with the walking distance (cm) and provides a direct index of locomotion.

Locomotor and vertical activities were recorded every 5 min for 2 consecutive hours. The locomotor and vertical activities were also measured every 1h for 48 consecutive hours. *Caps1* Hz and WT mice were placed in the activity boxes at 17:00 h. The floor of each box was covered with sawdust and there was food and water on disposal.

Motor activity and exploratory behavior in the open field

Locomotor activities were recorded in an open field (55 × 55 × 30 cm) under high illumination (100 lux). The floor and the walls of the open field were white, and care was taken to minimize shadows in the box. The locomotion behavior of each animal was videotaped for 9 min and scored from a video monitor placed in a nearby room. The floor of the box was virtually divided in 2 areas: a 20x20cm square in the center of the box and the periphery.

Circadian activity and food and water intake.

Spontaneous locomotor activity and rears were measured using individual boxes equipped with infra-red captors. The quantity of water and food consumed during the test period using automated pellet feeder and lickometer (Imetronic, Pessac, France). Mice were first tested under 12-12 light/dark cycles for 1 week (188 h) including 8h habituation and 7 complete dark/light circadian cycles (12/12h: light on at 7:00). Afterwards, they are returned to their home cages and placed in a constant darkness for 3 weeks (21 days). They were then tested again in constant darkness for one week (188 h) (7 complete cycles). Results are expressed per 1 h periods. For specific evaluation of a potential shift of the light-dark rhythm, data were also analyzed per 10 min periods for the 3 h before and 3 h after the light/dark switches, and before and after the main change in circadian activity.

Forced swimming stress

The forced swimming test was adapted from(21). Animals were forced to swim individually in a vertical glass cylinder (height: 28 cm; diameter: 15 cm) containing 23.5 cm of water maintained at $25\pm 1^{\circ}\text{C}$. After 6 min in the water they were removed and allowed to dry in a heated enclosure. The latency, the number of immobility, total immobility duration and total swimming duration were recorded by an observer blinded to the genotype. An animal was judged to be immobile whenever it remained floating in the water in a slightly hunched but upright posture, the head just above the water. An observer seated 1 m away from the glass cylinder, performed the behavioral measurements, in order to correctly evaluate the paw movements of the animal.

TST

Mice were suspended by the tail with tape to a vertical aluminum bar. Mice were positioned such that the base of their tail was aligned with the bottom of the bar. The distance between the tip of the nose of the mouse and the floor was approximately 20 cm. The mice were suspended for a period of 6 min. The latency before the first episode of immobility and the time spent immobile during the 6 min was recorded for each individual, by an observer blinded to the genotype.

Marble burying

Mice were individually placed into cages (28×17×25 cm) filled with wood chip bedding to a depth of 4 cm for a 60-min testing period. Prior to each testing round, 12 identical glass marbles (15mm diameter) equidistant across the bedding surface in a 6x2 arrangement. To prevent escapes, each cage was covered with a filtering lid. Light intensity in the room was set at 60 lux. Animals were given 60 min of exposure to the marbles, and two observers blind to genotype measured the number of marbles visible at 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 60 min.

Dark/light box

The dark-light box consisted of a polypropylene box unequally divided into two chambers separated by a small opening (8.5×5 cm). Two thirds of the total area was a brightly lit chamber (750 lux) while the remaining one third was a dark chamber. Caps1 Hz and WT mice were released into the enclosed area and observed for 10 minutes. The latency, the number of dark/light transition and total light exposition

duration were recorded. An observer seated 1 m away from the box, performed the behavioral measurements.

Unpredictable Chronic Mild Stress (UCMS)

The stressful environments included social isolation, overcrowded cage, tilted cage, empty cage, damp sawdust cage, addition of rat feces, restraint space, circadian disturbance (reversed light/dark cycle), period of continuous overnight illumination, overnight period of difficult access to food (without a reduction in the daily food ration). These conditions were selected randomly every day. These treatments were applied 1 ~ 12 h in durations and 1 ~ 12 h in intervals. The durations and intervals were unpredictable to these mice. This UCMS was sustained for 4 weeks before the first behavioral test session, and for 5 months in total.

Acute stress assay

The experiment was carried out as described previously(22). In order to quantify hormones release during acute stress, mice contention assay were performed and blood from tail were collected between 10 :00 and 12 :00 A.M. using a microcuvette capillary tube (Sarstedt, Germany). Adult (11 months) mice were moved from the vivarium to a temperature and light controlled behavioral testing room for acclimation. Before the acute stress tail clipping was used for blood collection in the meanwhile mice were freely walking in a box (Sarstedt, Germany) to avoid stressful environment. This blood collection was realized in less than 2 minutes to avoid CORT secretion due to stress. Immediately, restrained mice were placed in a 50-ml plastic Falcon tube for 30 min. The tube was holed at the extremity, approximately 5 mm just in front of the mice to allow for sufficient ventilation. At the end of the acute

restraint, blood was collected. Animals were then returned to their home cage, and a final blood sample was collected at 30min after the end of the acute stress. Mice were decapitated to remove brain samples. After the conclusion of blood collection, plasma was isolated by centrifugation and stored at -80°C.

Acoustic startle reflex reactivity and Pre-pulse inhibition.

Acoustic startle reactivity and pre-pulse inhibition of startle were assessed in a single session using standard startle chambers (SR-Lab Startle Response System, San Diego Instruments, USA). Ten different trials type were used: acoustic startle pulse alone (110-db), eight different prepulse trials in which either 70, 75, 85 or 90-dB stimuli were presented alone or preceded the pulse, and finally one trial (NOSTIM) in which only the background noise (65 dB) was presented to measure the baseline movement in the Plexiglas cylinder. In the startle pulse or prepulse alone trials, the startle reactivity was analyzed and in the prepulse plus startle trials the amount of PPI was measured and expressed as percentage of the basal startle response.

Sucrose preference.

Mice were first habituated to sucrose (0.8 %) overnight then sucrose preference was evaluated on the 3 consecutive days mainly during the dark phase (repeated measurements).

On the first day, mice are habituated overnight to sucrose in their home cages, where water is replaced with 0.8 % sucrose solution (from 5pm to 9am the following day). From the second to the 4th days, mice were individually transferred to the testing cages 2h before the light off (5 pm) with food available ad lib. One hour later (6pm), two bottles of water and 0.8 % sucrose are provided for 15h (from 6pm to 9am the

following day). All the 3 days measurements are used for evaluation of sucrose preference.

Biochemical protocols

Western blot

Extraction. When the adult mice were killed, the brains were rapidly removed. Total brain or brain parts (pre-frontal cortex (PFC), striatum, ...) were dissected and stored at -80°C. Tissues were lysed manually in a PBS solution containing 0.1% Triton X-100 and a protease inhibitor cocktail (Roche, France) in 500µl for PFC and 100µl for Striatum. Homogenates were then centrifuged at 20.000x g for 30min at 4°C and supernatant containing proteins was determined using Bradford assay (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA). Solution at 2µg/µl were made in 100µl containing the LDS Sample buffer diluted at 1 : 4 (NuPage, Novex, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) and 1µM dithiothreitol (DTT, Applichem), were boiled at 95°C for 5min to denature the proteins. 20µg proteins were loaded on an acrylamide-Bis acrylamide gel (NuPage 4-12%Bis-TrisGel, Novex). Proteins were migrated from 50V to 200V at constant current. Proteins were then transferred on 0,45µm nitrocellulose membrane (NuPage, Novex, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) for 2h at 150mA, aspecific sites were blocked for 1h with a solution of milk (5%) and tween 0,1% Applichem) diluted in PBS. Membrane was then incubated with primary antibody diluted in the blocking solution over-night at 4°C. The day after, membrane was washed three times with PBS containing Tween (0,1%) and incubated with secondary antibody for 1h30 in the blocking solution, and washed again three times with the same solution. Membranes were revealed by enhancing chemiluminescence (ECL) substrate for horseradish peroxidase (HRP)

with the Super Signal West Dura system (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA), visualized with the G : BOX Chemi systems (Syngene, Cambridge, UK), and band intensity quantification was measured at the same exposure time and adjustment with ImageJ software (Wayne Rasband NIH, 1997).

Plasma Cortisol level quantification

Collection of plasma was describe in the acute stress assay section.

Assay. Serum cortisol concentrations were determined at dilution 1 :100 with the commercial Cortisol assay (Abnova, Taiwan) in triplicate, according to the manufacturer's instructions.

Hippocampal BDNF level.

Extraction. When the mice were sacrificed (11month old), the brains were rapidly removed. Bilateral hippocampi were rapidly dissected and stored at -80°C. At the time of analysis, and BDNF was extracted as described by Szapacs *et al.*, 2004(23). Four hundred microliters of lysis buffer (100mM PIPES, 500mM NaCl, 0.2% Triton X-100, 2%BSA, and 2mM EDTA) containing freshly prepared protease inhibitors (200µM PMSF, 0.3µM aprotinin, and 10µM leupeptin) were added to each sample. Samples were then sonicated by a moderate pulse of 5s. All homogenates were centrifuged at 16.000X *g* for 30 min at 4°C, and supernatants were removed and 200µl were freshly used for the assay, the remaining 200µl were frozen at -80°C for further protein experiment.

Assay. BDNF concentrations were determined at dilution of 1 :2 with the commercial *E*_{max} BDNF assay (Promega, Madison, WI, USA), in 96-well plates (Corning Costar EIA plate) in duplicate, according to the manufacturer's instructions.

Statistical analysis.

Data were analyzed using unpaired Student *t*-test or repeated measures analysis of variance (ANOVA) with one between factor (genotype) and one within factor (time, ...). When variables did not follow a normal distribution, statistical analyses were carried out using the nonparametric Mann-Whitney rank sum test. The level of significance was set at $p < 0.05$. Student's *t*-tests were conducted using the software Prism 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Error bars represent s.e.m.

Results

***Caps1*^{+/-} mice are more active than wild type littermate.**

Locomotor activity was measured in the home-cage by actimetry (Figure 1a). During night the heterozygous mice are more active during the seven cycles trials than the WT (Two-way ANOVA, genotype effect, $F(1,264)=8.496$, $P=0,0039$), especially during the light and dark phases transition between 6 :10pm and 7:40pm (One-way ANOVA, genotype effect, $F(1,220)=4.235$, $P=0,0408$, Figure 1b). Moreover, mice rearing are also slightly increased at the beginning of the night cycles for the heterozygous mice as compared to the WT (data not shown). To confirm these previous results, and assess for locomotor activity in response to a novel anxiogenic environment, we measured the activity in the open field (Figure 1c,d). Overall locomotor activity was higher in the heterozygous group than in the WT group, as evident from the total distance traveled of the *Caps1*^{+/-} mice, when they were one month old (One-way ANOVA, genotype effect, $F(1,288)=11.65$, $P=0.0007$, Figure 1c) as in the center zone of the open-field (One-way ANOVA, genotype effect, $F(1,288)=16.18$, $P<0.0001$, Figure 1d).

In response to chronic stress, evaluation of locomotor activity in the open-field was also assessed (Figure 4a). At the age of eight months, the heterozygous group still displayed increased total activity, but less marked when the mice were chronically stressed, suggesting that stress has an effect on locomotion, when one *Caps1* allele is missing.

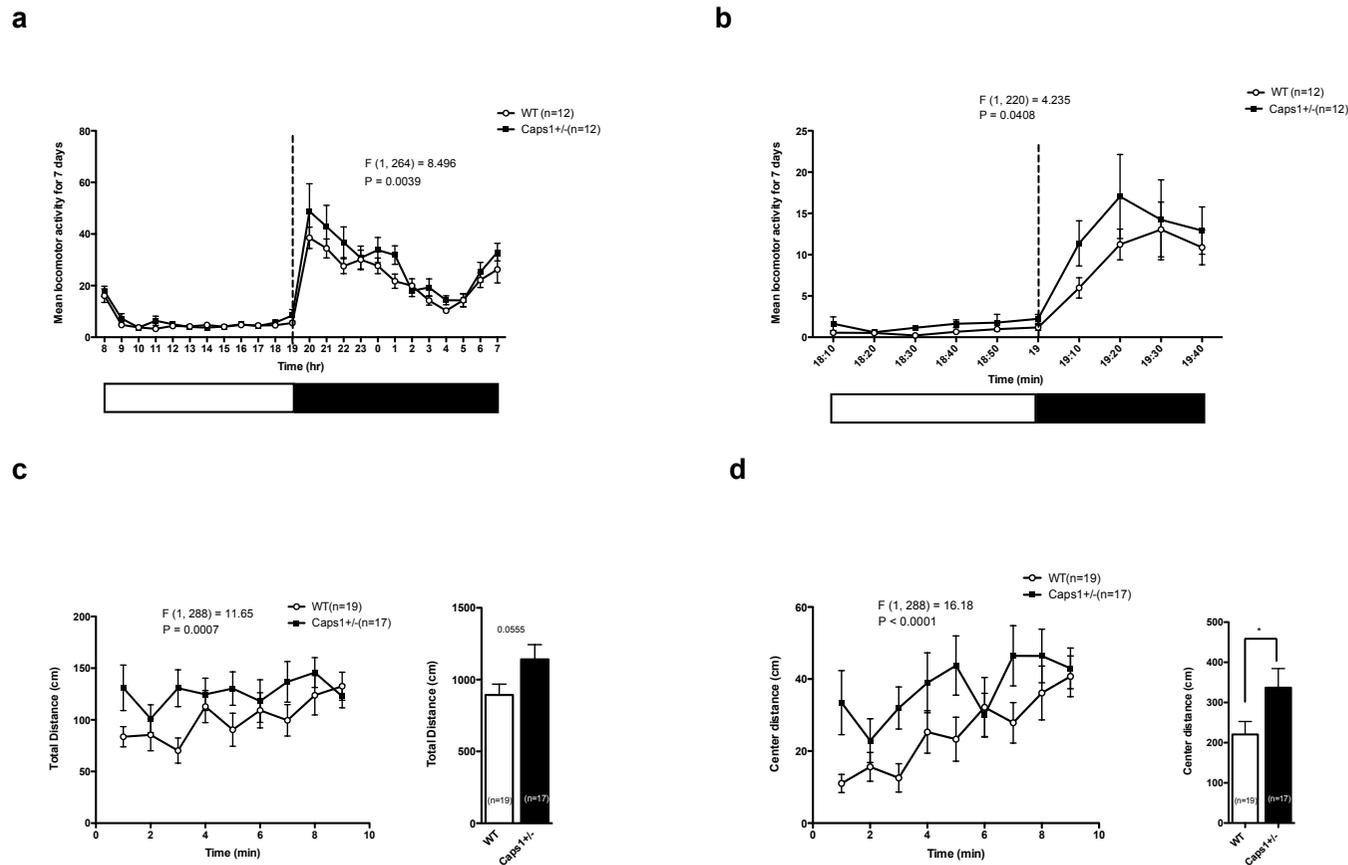


Figure 1. *Caps1*^{+/-} mice exhibit slight increased spontaneous activity. (a) To study spontaneous locomotion, mice were placed for 7 consecutive days in individual boxes equipped with infra-red captors and their activity was recorded hour by hour for 24h or (b) each 10min for 3h between night and dark phase transition. *Caps1*^{+/-} mice displayed increased spontaneous locomotor activity during the first half of the night phase compared to WT mice (One-way ANOVA, genotype effect, F(1,220)=4.235, $P=0.0408$). (c) To study novelty induced activity in the open-field, mice were placed in one corner of an open-field arena and their behavior was recorded for 9min. *Caps1*^{+/-} mice displayed a significant increased of the total distance (One-way ANOVA, genotype effect, F(1,288)=11.65, $P=0.0007$) or (d) distance traveled in the center of the open-field compared to the WT (One-way ANOVA, genotype effect, F(1,288)=16.18, $P<0.0001$).

***Caps1*^{+/-} hyperactivity is correlated with less behavioral despair.**

Depressive-like behaviors were evaluated using the forced swim test (FST) and the tail suspension test (TST) (Figure 2a,b). When they were tested, heterozygous mice renounced less to behavioral despair, as they swim more (unpaired t test $t(20)=2.258$, $P= 0.0352$) and spent more time to renounce in the FST (unpaired t test $t(19)=4.166$, $P<0.001$). As well as in the TST, where heterozygous mice despites lower immobility time than WT littermate (unpaired t test, $t(16)=2.332$, $P= 0.0331$, Figure 2b), meaning that they were less resilient in a depressive situation than the WT. Moreover these previous observations were confirmed by hedonic evaluation of the mice behavior, where the *Caps1*^{+/-} heterozygous mice did not decrease their sucrose preference for three days (Figure S2a), or total food intake for seven days (Figure S2b) as compared to the WT mice. These results are in adequacy with the hyperactive phenotype observed previously for the *Caps1*^{+/-} mice by evaluating locomotor activity.

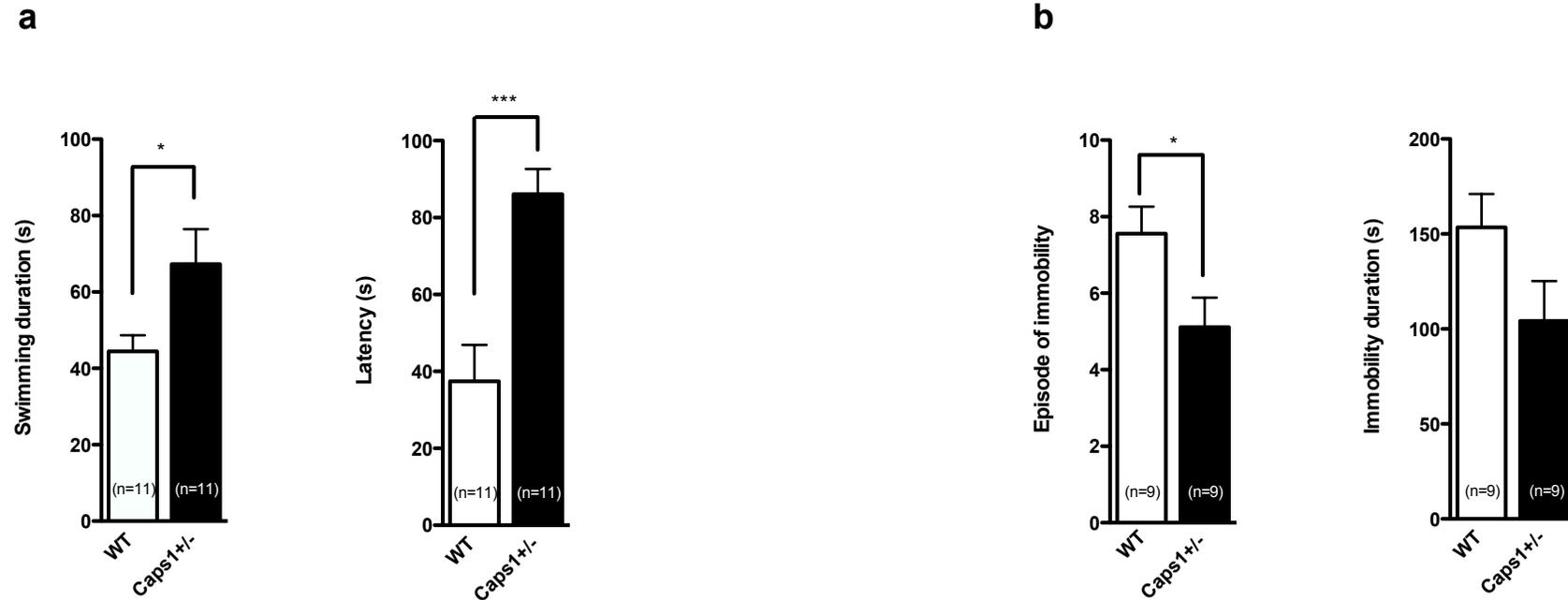


Figure 2. *Caps1*^{+/-} mice displayed decreased depressive-related behaviors in the forced swim (FST) and tail suspension tests (TST). (a) Swimming duration (unpaired t test $t(20)=2.258$, $P= 0.0352$) and latency to immobility were significantly increased (unpaired t test $t(19)=4.166$, $P<0.001$) in the *Caps1*^{+/-} mice compared to the WT. (b) In the TST episode of immobility was significantly reduced (unpaired t test, $t(16)=2.332$, $P= 0.0331$) for the *Caps1*^{+/-} mice compared to the WT.

***Caps1*^{+/-} mice respond to anxiety-related tasks differently than wild-type littermate.**

Anxiety-like behaviors were evaluated using the marble burying and dark-light box tests (Figure 3). For these two tests the heterozygous mice tend to respond differently than the WT littermate to anxiety-related task, as they burying slower new objects in the cage (One-way ANOVA, genotype effect, $F(1,21.36)=4.396$, $P<0.0377$, Figure 3a) whereas they got a tendency to spent more time to enter in the lighted anxious box of the dark-light box compared to the WT mice (Figure 3b). Also, during the chronic stress period, marble burying test was again assessed confirming that the *Caps1*^{+/-} old mice spent more time to bury new object (One-way ANOVA, genotype effect, $F(1,252.3)=39.63$, $P<0.0001$, Figure 4b), whereas effect of chronic stress can normalize this phenotype by increasing the velocity to bury. All these results showed that heterozygous *Caps1*^{+/-} mice respond differently than WT to threat avoidance-related behavior, and that chronic stress can inexpertly reverse this phenotype. Nevertheless, these anxiety related behaviors observed for the heterozygous group is not associated with potential differences in sensorimotor response, where the measurement of the pre-pulse inhibition is not affected by the genotype (Figure S1). Meaning that anxiety response for the heterozygous group, did not affect the auditory fear conditioning of the heterozygous mice.

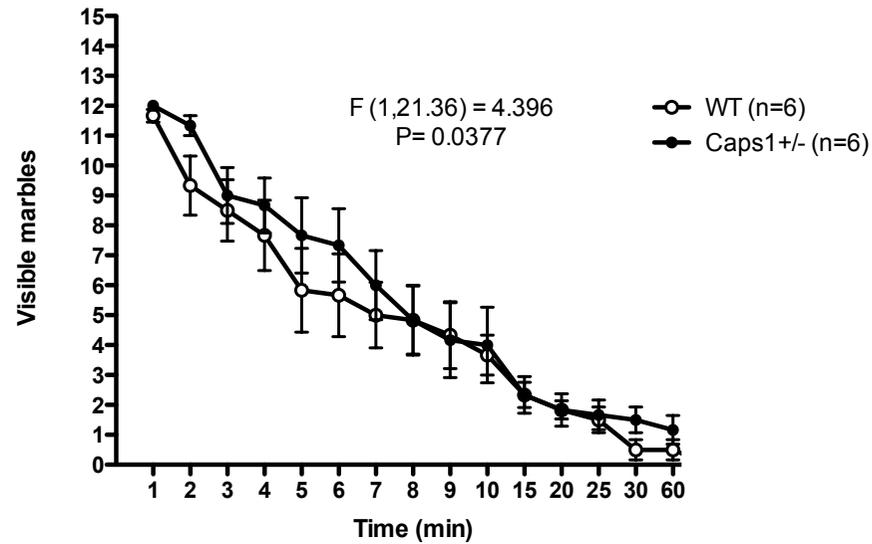
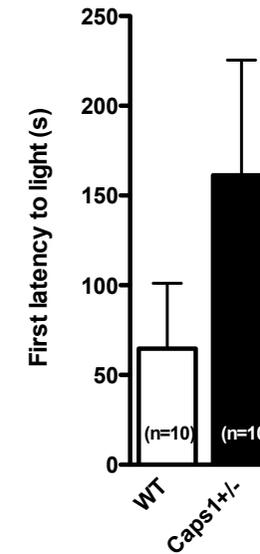
a**b**

Figure 3. *Caps1*^{+/-} mice displayed different anxiety-related behaviors in the marble burying and dark-light box tests compare to WT. (a) Velocity to bury visible marbles was slower in the *Caps1*^{+/-} mice compare to the WT (One-way ANOVA, genotype effect, F(1,21.36)=4.396, $P < 0.0377$). (b) Latency for first entry to the anxiogenic lighted box is slightly higher for the *Caps1*^{+/-} mice compare to the WT.

***Caps1*^{+/-} stressed mice plasma corticosterone remains at high level after recovery period.**

Unpredictable chronic mild stress (UCMS) followed by acute stress for 30 min and a recovery period was used as a paradigm to assess the stress hormone response during time in the animals, as it was previously published by J.A. Rooper et al., 2010(22). Corticosterone (CORT) plasma concentrations measured by ELISA assay (Figure 4c), were slightly increased for both genotypes after UCMS at the first sample (S1), and highly increased after the acute stress for each group (S2), confirming the relevance of the UCMS protocol. After the recovery period (S3), CORT level start to decrease for wild-type mice but still increasing for the *Caps1*^{+/-} heterozygous group which received the UCMS (uncorrected Fisher's LSD, genotype effect, $t(87)=1.154$, $P<0.001$, Figure 4c). These results are in concordance with the behavioral anxiety related phenotypes observed for the heterozygous genotype.

***Caps1*^{+/-} corticosterone level is not correlated with a decreased hippocampal BDNF level.**

After the recovery period, mice were decapitated and fresh tissues were collected. There were no genotype or stress effects on hippocampal-wet weights. Hippocampal BDNF levels were measured by ELISA detection assay (Figure 4d), and levels were higher for the heterozygous group who received the UCMS than the others, particularly when comparing to the unstressed group (uncorrected Fisher's LSD, genotype effect, $t(25)=2.897$, $P=0.007$) or the WT stressed group (uncorrected Fisher's LSD, genotype effect, $t(25)=2.497$, $P=0.0195$). These results are in concordance with the reduced behavioral despair phenotypes observed for the

heterozygous group where stress environment seems to act positively on this group of mice.

In order to understand the regulation of these two key neurohormones, in the pathophysiology of BD, we then plotted the behavior of the BDNF levels in function of the CORT level for WT compared to *Caps1*^{+/-} genotype (Figure 4e,f). As it was previously demonstrated for depressive phenotype (24), there is no correlation between BDNF and CORT level for the WT group ($R^2=0.029$, Figure 4e), whereas when a copy of *Caps1* is missing BDNF level act in concordance with CORT level ($R^2=0.45$, Figure 4f), meaning that this protein could inhibit the regulating pathway between these two, involved in the stress response.

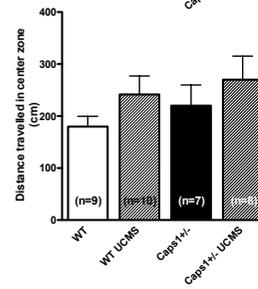
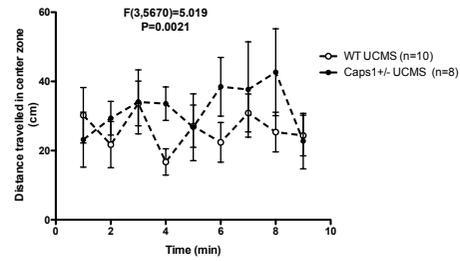
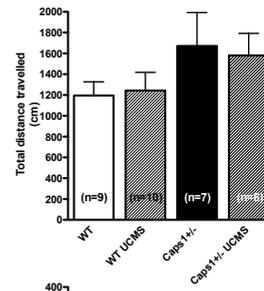
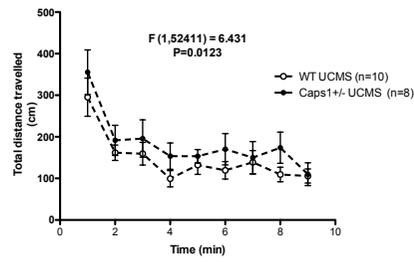
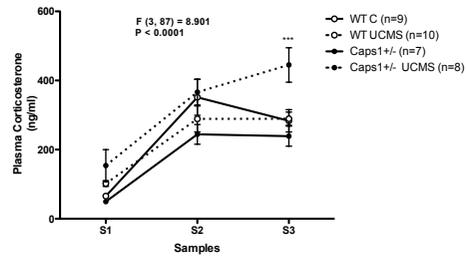
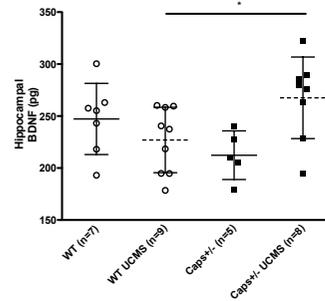
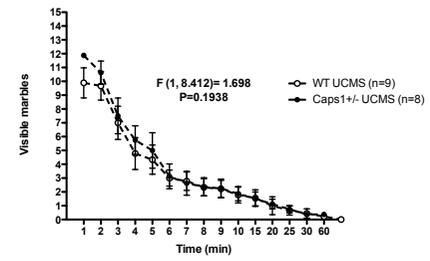
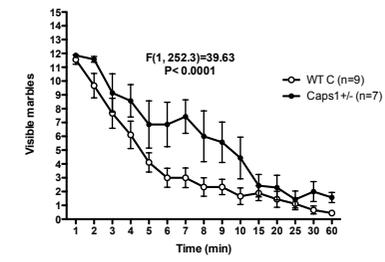
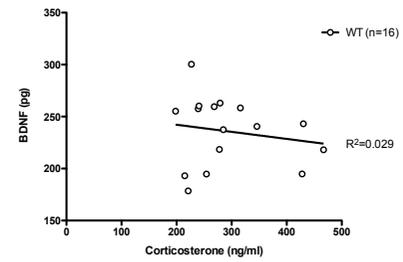
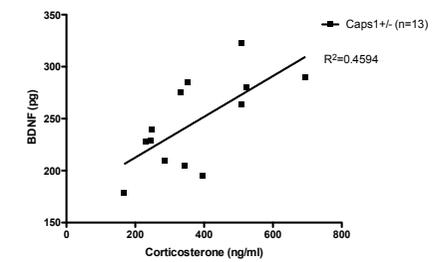
a**c****d****b****e****f**

Figure 4. Effects of the unpredictable chronic mild stress (UCMS) protocol on biochemical, behavioral parameters on control and stressed mice. (a) Spontaneous locomotion in the open-field was recorded for 9min. *Caps1^{+/-}* stressed mice show a slight increased of the total (Two-way ANOVA, genotype effect, $F(1,52411)=6.431$, $P=0.0123$) and center distance traveled in the open-field test as compared to WT (Two-way ANOVA, genotype effect, $F(3,5670)=5.019$, $P=0.021$). (b) In contrast to the unstressed group, after chronic stress, *Caps1^{+/-}* mice buried at the same velocity as the WT stressed mice. (c) Determination of serum corticosterone in controls and stressed animals show an increase in the corticosterone concentration for the *Caps1^{+/-}* stressed mice compared to WT during the recovering period (S3) (uncorrected Fisher's LSD, genotype effect, $t(25)=2.497$, $P=0.0195$). (d) Determination of hippocampal BDNF concentrations in stressed and controls, show an increase in the BDNF concentration for the *Caps1^{+/-}* stressed mice compared to the unstressed *Caps1^{+/-}* group (uncorrected Fisher's LSD, genotype effect, $t(25)=2.897$, $P=0.007$) or to the WT stressed group (uncorrected Fisher's LSD, genotype effect, $t(25)=2.497$, $P=0.0195$). (e) Levels of BDNF are not correlated with Corticosterone for WT animals ($R^2=0.029$), (f) whereas it is the case for the *Caps1^{+/-}* ($R^2=0.4594$).

***Caps1*^{+/-} stressed mice decreased the SNAP25 protein expression in the cortex.**

Total brain tissues were extracted and some synaptic proteins expression were evaluated (Figure 5a). Quantification confirmed that *Caps1*^{+/-} mice expressed half CADPS protein compared to WT (unpaired t test, $t(4)=33.66$, $P<0.0001$), without changing the expression of other proteins (Figure 5b). For the stress trial, after the recovery period, mice were decapitated and fresh tissues were collected. Cortex SNARE associated proteins levels were measured by western-blotting assay (Figure 5c), and revealed that CADPS protein expression is increased after stress for the WT (uncorrected Fisher's LSD, $t(11)=3.127$, $P=0.009$), whereas SNAP25 protein level was decreased in the cortex of the stressed heterozygous group as compared to the WT stressed group (uncorrected Fisher's LSD, $t(11)=2.304$, $P=0.04$). These results are in concordance with the CORT level dosage observed in this group.

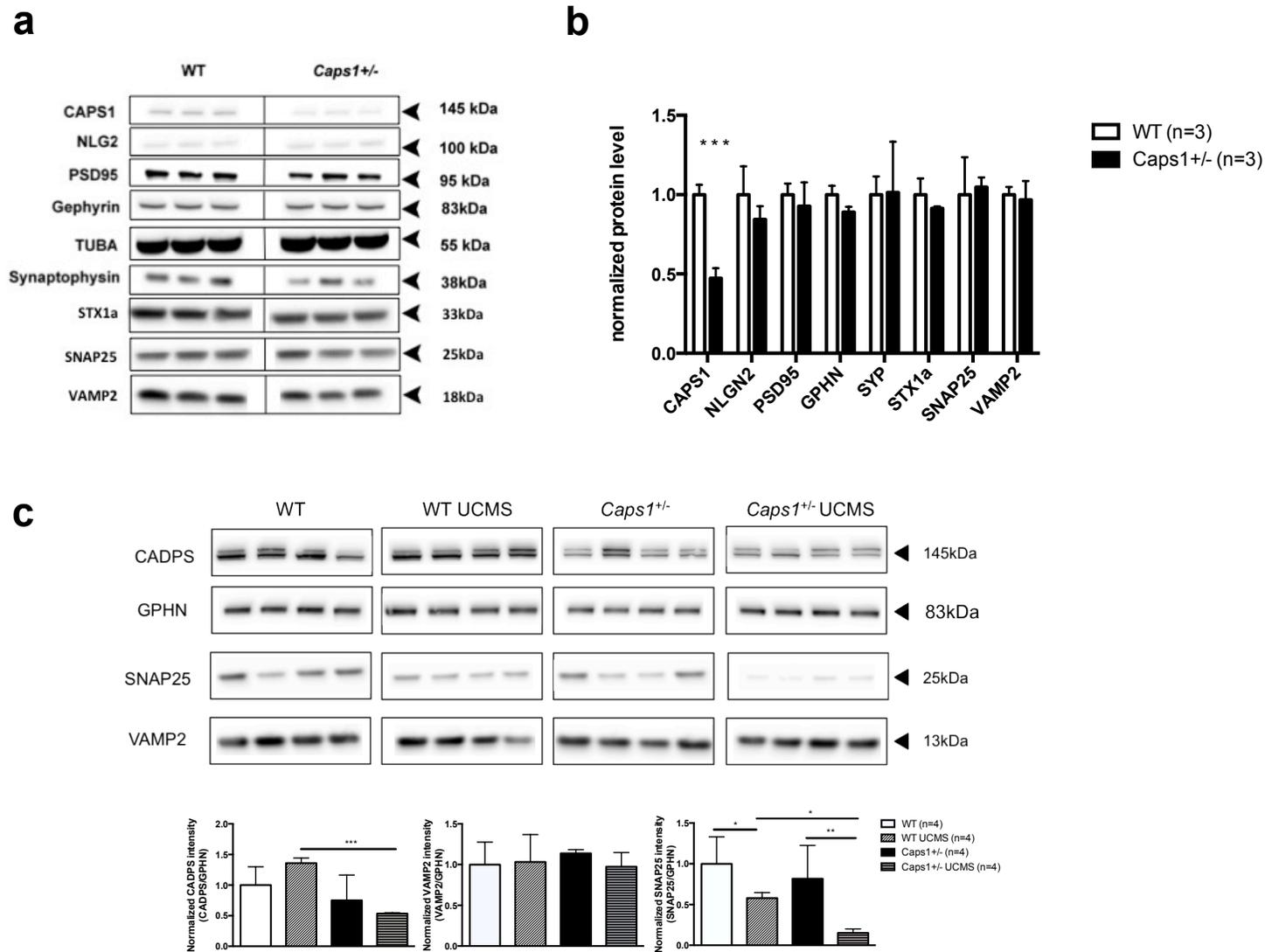


Figure 5. Expression analysis of synaptic proteins in *Caps1*^{+/-} and WT mouse brain. (a) Western-blot of total mouse brain against synaptic proteins and (b) quantification (multiple t tests, $P < 0.05$) (c) Western-blot of cortex mouse brain against synaptic proteins and quantification (uncorrected Fisher's LSD, $P < 0.05$).

Discussion

In this study we were able to demonstrate for the first time, that *CADPS* (aka *Caps1*) gene plays a critical role in the general control of anxiety related behaviors including hyperactivity, and biochemical stress response. These features were demonstrated repeatedly in multiple tests (Figure 1,4). *Caps1*^{+/-} mice displayed these features without impairment of sensory-motor function (Figure S1). Furthermore, this anxiety related behaviors are not associated with depressive like behaviors (Figure 2).

CADPS protein is known to function in the exocytosis machinery, to promote the release and uptake of excitatory neurotransmitters, monoamines and catecholamines in adrenal glands. We previously demonstrated that the 3p14 region of the chromosome and single nucleotide polymorphisms in this gene are significantly associated with EOBD(25)(26). Notably, a deletion of the entire exon 2 of the *CADPS* gene found only in EOBD patient, impaired drastically the *CADPS* function. Evidence also suggests that deletion of the second isoform of *CADPS* (*Caps2*) is associated with autistic like phenotypes(27). Nevertheless, unlike *Caps2* KO mice, *Caps1* are not available due to birth death allowing us to only study the heterozygous mice for more subtle behavioral and biochemical phenotypes. In fact, behavioral experiments cannot recapitulate the symptomatology observed in patients and interpretations should be measured. For instance, interpretations of lower behavioral despair in the TST or FST, or slower burying in the marble-burying test are not expected results. Controversial interpretations of the marble-burying test came from the fact that evaluating anxiety could be a result of a defensive or a freezing behavior aiming to avoid threats(28). As a strategy to interpret the results, we decided to analyze young males and confirmed it for stress paradigm when they were elder.

Nevertheless, it could be relevant to pool the data for male and female to see if we can increase the power and strength of these previous data.

Mania traditionally manifests as severe mood elevation (either euphoria or irritability) and is accompanied by behavioral excitement including hyperactivity and psychomotor agitation in goal-directed activity and recklessness(29). Consistent with the genetic and functional findings on *CADPS*, *Caps1^{+/-}* mice displayed behavioral alterations (Figure 1-5) that appear to be phenocopies of the behavioral symptoms of manic related symptoms, although the mood and thought states of these mice are obviously unknown. These phenotypes observed are not exclusive to manic symptoms but can be directly link to several neuropsychiatric illnesses, such as ADHD or PTSD(30). Conversely, depression is often associated with reduced locomotor activity, faster resiliency to a goal-directed activity or anhedonia. In our experiments, *Caps1^{+/-}* mice developed less marked behavioral despair than the WT in the FST or TST tests and are not anhedonic considering their sucrose consumption. These observations are in light with the manic state of the pathology. Additionally, these mice do not show deficits in prepulse inhibition tests. These are tests in which deficits are often observed in models of schizophrenia, mental retardation or dementia (31). These lines of evidence do not support the relevancy of the behavioral excitement phenotype in *Caps1^{+/-}* mice to these clinical conditions.

As mentioned in the introduction, stress is the major modulator of environmental changes that could be physiologically perceived as damaging or protective. Therefore, neuropsychiatric diseases, such as BD, which are multifactorial, could be explained by personal life events where adaptation to stressors (allostasis) and genetic predispositions leads together to brain and bodily deregulation. Difficulties to understand the involvement of stress on neuropsychiatric diseases, came from

complex nonlinear interactions between different types of stress and allostatic load and overload from systemic hormones regulation to body changes. Because of this, the stress effects often result in an inverted- U- shaped dose-response relationship. At a molecular level, previous work has shown that BDNF levels remained highly dynamic, in fact microarray study of FST after chronic restrain stress recovery show that the elevated baseline of BDNF remain higher after recovery, suggesting a possible mechanism to facilitate recovery from chronic stress in normal mice (32), where « good stress » can promote the synaptic transmission, adult neurogenesis and long-term potentiation(33). Moreover, in the hippocampus, a brain region highly populated with glucocorticoids receptors, it has been shown that adult-born hippocampal neurons are required for normal expression of the endocrine component of the stress response, suggesting a role of the hippocampus in regulation of the HPA axis (34).

Altogether, in our experiment paradigm, chronically *Caps1*^{+/-} stressed mice kept increasing their glucocorticoid level after a period of recovery from an acute stress as well as their BDNF hippocampal level in a correlated fashion. These biochemical results are consistent with the observed anxiety-related behaviors as they respond positively to anxiety-related test after a chronic mild stress, meaning that this gene could be involved in the modulation of the stress response. Further studies should test the impact of common drugs used in psychiatry in order to rescue the observed phenotypes, to confirm this mice as a model of neuropsychiatric illness.

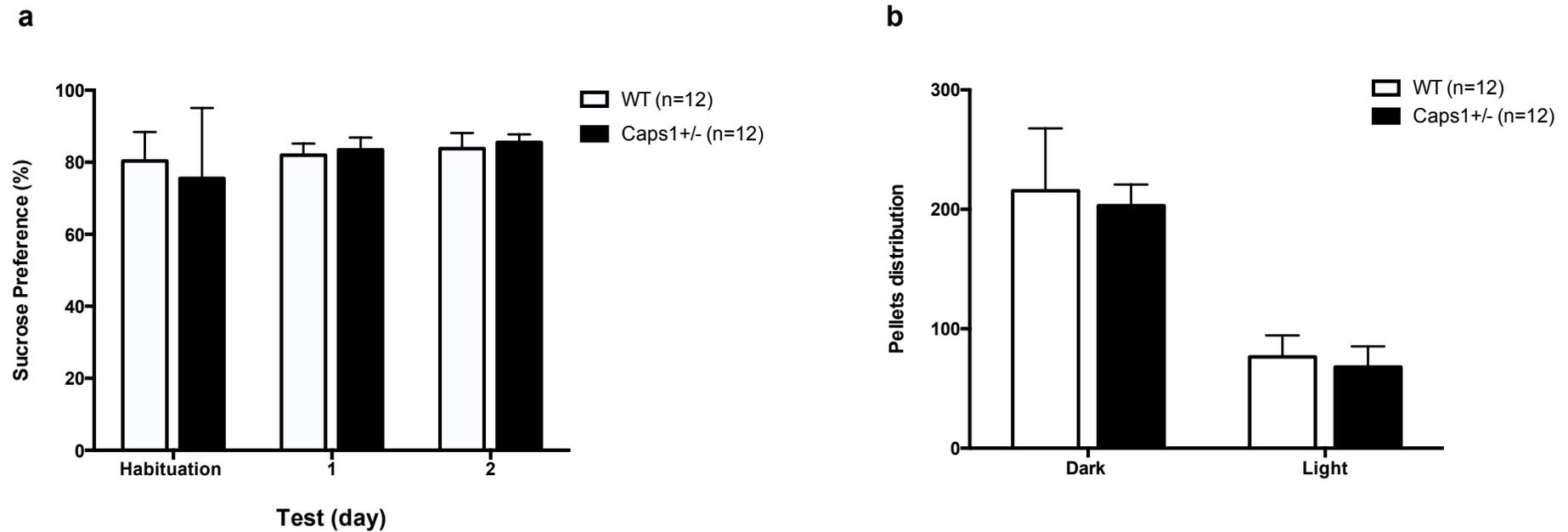


Figure S1. Hedonic behaviors are not altered in the *Caps1*^{+/-} mice compared to the WT. (a) Anhedonia was challenged as the total sucrose preference solution drunken by WT and *Caps1*^{+/-} mice (b) as well as the total pellets distribution for seven consecutives days.

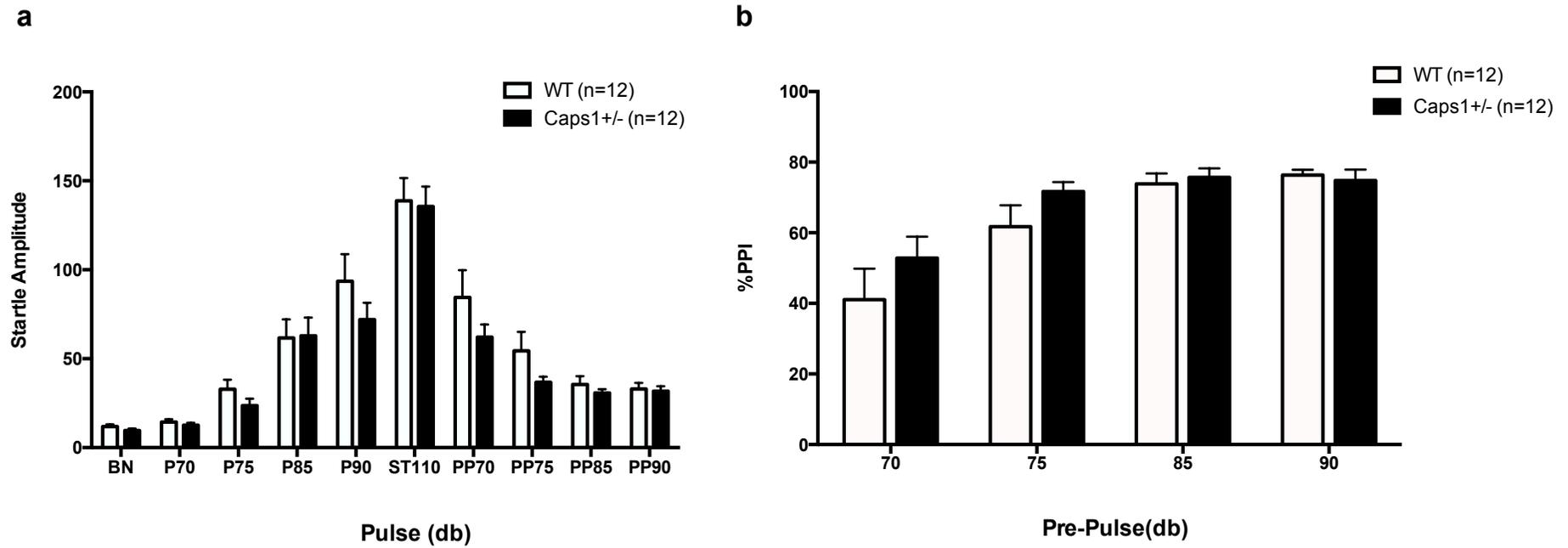


Figure S2. Caps1+/- mice have no impairment in the acoustic startle response. (a) Startle amplitude response after different stimuli or (b) inhibition of startle amplitude after pre-pulse are not altered in the Caps1+/- mice compared to the WT.

References

1. Osby U, Brandt L, Correia N, Ekblom A, Sparén P. Excess mortality in bipolar and unipolar disorder in Sweden. *Arch Gen Psychiatry*. 2001 Sep;58(9):844–50.
2. Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature*. 2007 Jun 7;447(7145):661–78.
3. American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders: Dsm-5*. Amer Psychiatric Pub Incorporated; 2013. 991 p.
4. Goodwin FK, Jamison KR. *Manic-Depressive Illness: Bipolar Disorders and Recurrent Depression*. Oxford University Press; 2007. 1290 p.
5. Gray JD, McEwen BS. Lithium's role in neural plasticity and its implications for mood disorders. *Acta Psychiatr Scand*. 2013 Nov;128(5):347–61.
6. Sousa N. The dynamics of the stress neuromatrix. *Mol Psychiatry*. 2016 Mar;21(3):302–12.
7. Reddy MK, Meyer TD, Wittlin NM, Miller IW, Weinstock LM. Bipolar I disorder with comorbid PTSD: Demographic and clinical correlates in a sample of hospitalized patients. *Compr Psychiatry*. 2016 Aug 18;72:13–7.
8. Etain B, Lajnef M, Loftus J, Henry C, Raust A, Gard S, et al. Association between childhood dimensions of attention deficit hyperactivity disorder and adulthood clinical severity of bipolar disorders. *Aust N Z J Psychiatry*. 2016 Apr 11;
9. de Kloet ER, Joëls M, Holsboer F. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci*. 2005 Jun;6(6):463–75.
10. Südhof TC. Neurotransmitter Release: The Last Millisecond in the Life of a Synaptic Vesicle. *Neuron*. 2013 Oct 30;80(3):675–90.
11. Wojcik SM, Brose N. Regulation of membrane fusion in synaptic excitation-secretion coupling: speed and accuracy matter. *Neuron*. 2007 Jul 5;55(1):11–24.
12. Kasai H, Takahashi N, Tokumaru H. Distinct initial SNARE configurations underlying the diversity of exocytosis. *Physiol Rev*. 2012 Oct;92(4):1915–64.
13. Walent JH, Porter BW, Martin TF. A novel 145 kd brain cytosolic protein reconstitutes Ca²⁺-regulated secretion in permeable neuroendocrine cells. *Cell*. 1992 Sep 4;70(5):765–75.
14. Ann K, Kowalchuk JA, Loyet KM, Martin TF. Novel Ca²⁺-binding protein (CAPS) related to UNC-31 required for Ca²⁺-activated exocytosis. *J Biol Chem*. 1997 Aug 8;272(32):19637–40.
15. Speidel, Dina, Cathrin E. Bruederle, Carsten Enk, Thomas Voets, Frederique

16. Farina M, van de Bospoort R, He E, Persoon CM, van Weering JRT, Broeke JH, et al. CAPS-1 promotes fusion competence of stationary dense-core vesicles in presynaptic terminals of mammalian neurons. *eLife*. 2015;4.
17. Chen G, Henter ID, Manji HK. Translational research in bipolar disorder: emerging insights from genetically based models. *Mol Psychiatry*. 2010 Sep;15(9):883–95.
18. Speidel D, Varoqueaux F, Enk C, Nojiri M, Grishanin RN, Martin TFJ, et al. A family of Ca²⁺-dependent activator proteins for secretion: comparative analysis of structure, expression, localization, and function. *J Biol Chem*. 2003 Dec 26;278(52):52802–9.
19. Sadakata T, Itakura M, Kozaki S, Sekine Y, Takahashi M, Furuichi T. Differential distributions of the Ca²⁺-dependent activator protein for secretion family proteins (CAPS2 and CAPS1) in the mouse brain. *J Comp Neurol*. 2006 Apr 20;495(6):735–53.
20. Eckenstaler R, Lessmann V, Brigadski T. CAPS1 effects on intragranular pH and regulation of BDNF release from secretory granules in hippocampal neurons. *J Cell Sci*. 2016 Apr 1;129(7):1378–90.
21. Porsolt RD, Deniel M, Jalfre M. Forced swimming in rats: hypothermia, immobility and the effects of imipramine. *Eur J Pharmacol*. 1979 Aug 15;57(4):431–6.
22. Roper JA, Craighead M, O'Carroll A-M, Lolait SJ. Attenuated stress response to acute restraint and forced swimming stress in arginine vasopressin 1b receptor subtype (Avpr1b) receptor knockout mice and wild-type mice treated with a novel Avpr1b receptor antagonist. *J Neuroendocrinol*. 2010 Nov;22(11):1173–80.
23. Szapacs ME, Mathews TA, Tessarollo L, Ernest Lyons W, Mamounas LA, Andrews AM. Exploring the relationship between serotonin and brain-derived neurotrophic factor: analysis of BDNF protein and extraneuronal 5-HT in mice with reduced serotonin transporter or BDNF expression. *J Neurosci Methods*. 2004 Dec 30;140(1-2):81–92.
24. Mirescu C, Gould E. Stress and adult neurogenesis. *Hippocampus*. 2006;16(3):233–8.
25. Etain B, Mathieu F, Rietschel M, Maier W, Albus M, McKeon P, et al. Genome-wide scan for genes involved in bipolar affective disorder in 70 European families ascertained through a bipolar type I early-onset proband: supportive evidence for linkage at 3p14. *Mol Psychiatry*. 2006 Jul;11(7):685–94.
26. Etain B, Dumaine A, Mathieu F, Chevalier F, Henry C, Kahn J-P, et al. A SNAP25 promoter variant is associated with early-onset bipolar disorder and a high expression level in brain. *Mol Psychiatry*. 2010 Jul;15(7):748–55.
27. Sadakata T, Washida M, Iwayama Y, Shoji S, Sato Y, Ohkura T, et al. Autistic-like phenotypes in Cadps2-knockout mice and aberrant CADPS2 splicing in autistic

patients. *J Clin Invest*. 2007 Apr;117(4):931–43.

28. Aupperle RL, Paulus MP. Neural systems underlying approach and avoidance in anxiety disorders. *Dialogues Clin Neurosci*. 2010;12(4):517–31.

29. Belmaker RH. Bipolar disorder. *N Engl J Med*. 2004 Jul 29;351(5):476–86.

30. Rakofsky JJ, Ressler KJ, Dunlop BW. BDNF function as a potential mediator of bipolar disorder and post-traumatic stress disorder comorbidity. *Mol Psychiatry*. 2012 Jan;17(1):22–35.

31. Geyer MA, McIlwain KL, Paylor R. Mouse genetic models for prepulse inhibition: an early review. *Mol Psychiatry*. 2002;7(10):1039–53.

32. Gray JD, Rubin TG, Hunter RG, McEwen BS. Hippocampal gene expression changes underlying stress sensitization and recovery. *Mol Psychiatry*. 2014 Nov;19(11):1171–8.

33. McEwen BS, Bowles NP, Gray JD, Hill MN, Hunter RG, Karatsoreos IN, et al. Mechanisms of stress in the brain. *Nat Neurosci*. 2015 Oct;18(10):1353–63.

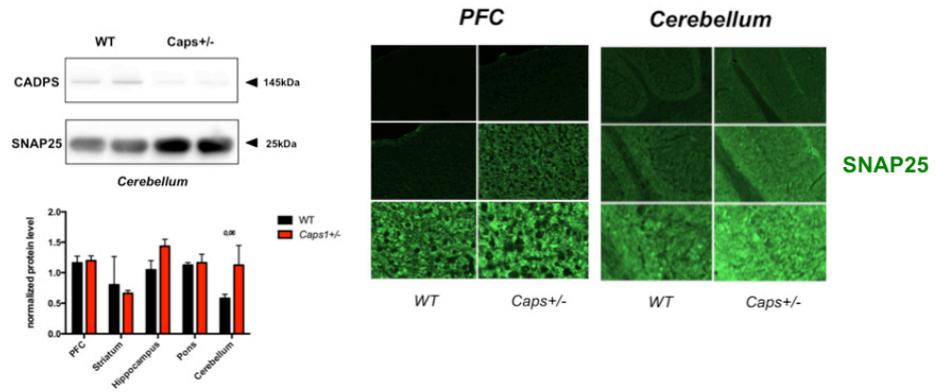
34. Roozendaal B, Phillips RG, Power AE, Brooke SM, Sapolsky RM, McGaugh JL. Memory retrieval impairment induced by hippocampal CA3 lesions is blocked by adrenocortical suppression. *Nat Neurosci*. 2001 Dec;4(12):1169–71.

Discussion partielle sur la caractérisation de la souris *Caps1*^{+/-}

*Études neuro-anatomiques des souris *Caps1*^{+/-}*

Pour approfondir la caractérisation physiologique des souris *Caps1*^{+/-} hétérozygotes, des études neuro-anatomiques peuvent être envisagées, dans le but de regarder l'expression ainsi que la localisation de certaines protéines synaptiques. C'est pourquoi, mis à part l'expression par western-blot, nous avons aussi réalisé des immuno-marquages fluorescents sur des coupes sagittales de cerveau de souris hétérozygotes comparé à des souris sauvages. Nous avons ainsi regardé l'expression des protéines SNAP25 et VAMP2 sur tissus frais par Western-blot et sur tissus fixés par immunohistochimie puis quantifié leur expression respective grâce au logiciel Image J. Ces observations préliminaires réalisées sur deux animaux par génotype, nous montrent que la localisation de ces partenaires synaptiques ne semble pas altérée alors que l'expression des protéines SNAP25 et VAMP2 semble augmentée dans le cervelet des souris hétérozygotes comparé aux souris sauvages. De manière intéressante, des études ultérieures réalisées dans notre laboratoire ont permis de montrer qu'une variation fréquente située dans le promoteur de *SNAP25* associée avec des formes à début précoce de trouble bipolaire avait une expression augmentée dans des cerveaux post-mortem de patients (Etain et al. 2010).

a



b

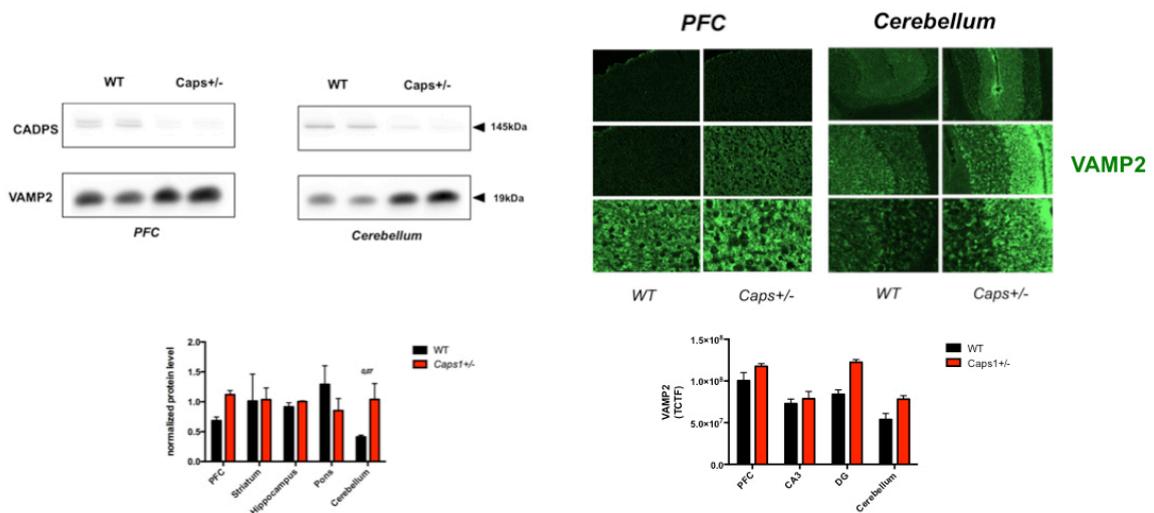


Figure II. 3. Expression des protéines SNAP25 et VAMP2 sur des cerveaux de souris *Caps1*^{+/-}

(a) L'expression de la protéine SNAP25 est augmentée dans le cervelet des souris *Caps1*^{+/-} comparé aux sauvages. Sur deux souris, l'expression par western-blot et sur coupe sagittale montre une augmentation de l'expression de SNAP25 dans le cervelet.

(b) L'expression de la protéine VAMP2 est augmentée dans le cortex préfrontal (PFC) et le cervelet des souris *Caps1*^{+/-} comparé aux sauvages. Sur deux souris, l'expression par western-blot et sur coupe sagittale montre une augmentation de l'expression de VAMP2 dans le PFC et le cervelet.

Sauvetage phénotypique par un traitement pharmacologique

Pour appuyer notre hypothèse d'un modèle murin nous permettant de mieux comprendre la physiopathologie des troubles bipolaires (hyperactivité, anxiété, réponse au stress dérégulée), d'autres expériences peuvent être envisagées. Malgré tout, les résultats obtenus sur le comportement ainsi que la réponse au stress de ces animaux hétérozygotes sont déjà des arguments forts pour l'associer à la symptomatologie retrouvée chez les patients. Ainsi, en se focalisant sur les résultats les plus robustes, il serait intéressant de tester ces mêmes caractéristiques après l'application d'un traitement thymoregulateur, pour tenter de sauver ces phénotypes. En effet, l'administration chronique de chlorure de lithium dans la nourriture des souris à une concentration de 4.0g/kg pendant 3 à 4 semaines a été largement mise au point pour obtenir une concentration plasmatique à 1mEq/L de lithium, équivalente à celle des patients sous traitement (O'Brien et al. 2004; Kovacsics and Gould, 2010). Ces données nous permettent, d'une part de confirmer cette hypothèse, et d'autre part de mieux comprendre la voie de signalisation du facteur neurotrophique BDNF en lien avec l'inhibition de la glycogène synthase kinase-3 (GSK-3) grâce au lithium, et de la sous expression de CADPS grâce au modèle étudié.

DISCUSSION

Les études épidémiologiques réalisées sur des sujets atteints de troubles bipolaires durant ces vingt dernières années ont montré une forte contribution génétique dans la prédisposition à ce trouble, avec une héritabilité proche des 60% (Lichtenstein et al. 2009) et un risque de récurrence chez les apparentés augmenté de huit fois par rapport à la population générale. Malgré l'avènement de nouvelles technologies permettant de réaliser des études génétiques à grande échelle, les nombreuses associations identifiées pour des gènes de vulnérabilité au trouble, ne permettent pas à ce jour de prévenir ou de traiter les patients de manière ciblée. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce fossé :

-Au niveau clinique, l'hétérogénéité de cette maladie ne nous permet pas de classer clairement les résultats génétiques obtenus.

-Au niveau physiopathologique le manque de connaissances des processus neurobiologiques qui permettent la régulation de nos émotions, ne nous permet pas de combiner l'ensemble des résultats génétiques pour en déduire une explication moléculaire.

-Au niveau écologique, la complexité de l'environnement qui impacte les régulations génétiques et la survenue d'un trouble bipolaire, n'est pas encore intégrée aux mécanismes physiopathologiques d'apparition de la maladie.

Ainsi, la contribution génétique dans ces maladies complexes doit être réfléchi différemment et selon deux paradigmes :

-Une combinaison d'une multitude de variations rares d'origine récente pour la survenue de cette maladie fréquente.

-Une interaction entre des variations fréquentes et l'environnement pour expliquer cette pathologie multifactorielle (Figure III. 1)

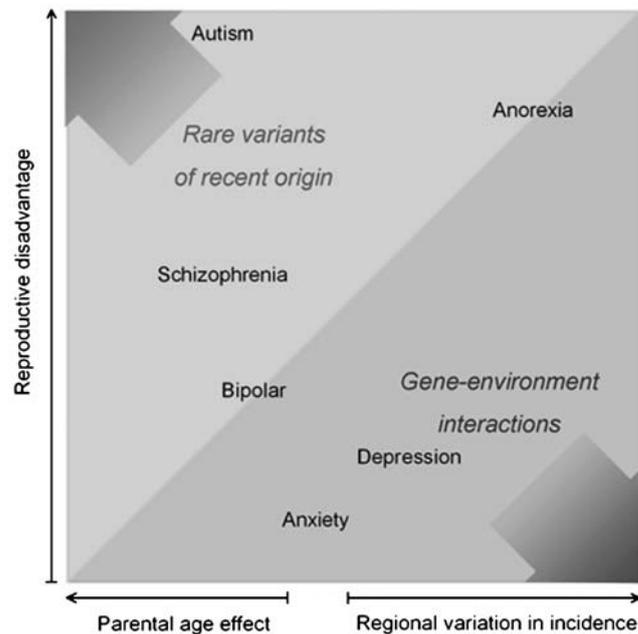


Figure III. 1. Estimation de la contribution des variations rares d'origine récente et de l'interaction gène-environnement dans l'étiologie des maladies psychiatriques, tout au long d'un spectre de désavantage reproductif. (Uher 2009)

Le désavantage reproductif est calculé comme le produit de la mortalité standard par le ratio de fertilité, et tracé le long de l'axe des ordonnées en logarithme. L'axe des abscisses correspond à l'impact de l'âge parental (sur la gauche) comme témoin de variations rares, et le taux de variations par incidence géographique (sur la droite) comme témoin de l'interaction gène-environnement. Cette représentation est probabiliste : les maladies proches du coin en haut à gauche sont plus susceptibles d'avoir une contribution d'une multitude de variations génétiques rares, alors que celles en bas à droite d'une interaction gène-environnement.

Néanmoins, la recherche de gènes de susceptibilité basée sur l'observation de critères objectifs reste une approche scientifique qui permet d'enrichir notre compréhension de la maladie. C'est dans cette démarche, que nos résultats suggèrent que le gène *CADPS* pourrait jouer un rôle dans la physiopathologie des troubles bipolaires.

Nos études génétiques pourraient impliquer ce gène.

La précédente étude de liaison que nous avons réalisé sur 87 paires de germains, nous montrait une liaison significative entre la région 3p14 du génome et le trouble bipolaire à début précoce (Etain et al. 2006). Notre étude d'association génétique réalisée sur des patients avec un trouble bipolaire, nous montre une association allélique entre une variation fréquente dans le gène *CADPS* et la maladie dont la stratification avec un âge de début précoce augmente la significativité. Enfin, la recherche de mutations rares dans ce gène a permis de dénombrer un taux de mutations non-synonymes trois fois plus élevé chez les patients atteints d'un trouble bipolaire à début précoce que chez les témoins. D'un point de vue génétique, la découverte de mutations rares au sein des gènes synaptiques peut, outre le fait de nous aider à comprendre le trouble, aussi nous permettre d'agir en amont pour améliorer le diagnostic et prédire la réponse au traitement. Ainsi, par rapport à la question de savoir quel serait l'intérêt d'avoir trouvé et étudié 8 mutations sur 150 patients avec un trouble bipolaire, on peut penser que des personnes portant ces mutations, dont particulièrement une délétion dans l'exon 2 du gène *CADPS* pourrait prédire le diagnostic de trouble bipolaire. Pour le reste, le taux de mutations trois fois plus élevé chez les patients que chez les témoins, nous informe sur une pression de sélection exercée sur celui-ci, pour protéger ce mécanisme physiologique cruciale.

Malgré tout, peu d'études génétiques à grande échelle répliquent nos résultats. De fait *CADPS* n'a jamais été cité comme un gène candidat au trouble bipolaire. Une raison peut être que les études génétiques à grande échelle sont contraintes à une sélection statistique d'autant plus stringente que le nombre de variations génotypées augmente. Cette démarche basée sur une augmentation du pouvoir statistique grâce à des méta-analyses regroupant le plus de patients possible s'abstient ainsi de variations plus rares par souci de robustesse. En effet, les études pangénomiques, s'intéressent aux variations fréquemment retrouvées dans le génome, alors qu'elles ne sembleraient contribuer qu'à

faible mesure dans l'étiologie des maladies psychiatriques (Figure I. 10). Or on peut penser cette maladie complexe d'un point de vue qualitatif (polygénique) plus que quantitatif (en terme de seuil de significativité). En effet, si la survenue de cette maladie réside dans l'association de variations peu fréquentes, on peut imaginer trois scénarios :

- L'association d'une ou plusieurs variations qui dépasse le seuil de significativité qui conduit à la maladie.

- Une ou plusieurs variations qui dépassent le seuil de significativité additionnées à une ou plusieurs variations qui ne franchissent pas ce seuil pour déclencher la maladie.

- Plusieurs variations qui ne franchissent pas le seuil de significativité qui conduisent à la maladie.

Ainsi je pense que les deux démarches entreprises, à savoir l'étude d'association et la recherche de mutations rares, sont toutes les deux informatives puisqu'elles nous permettent de donner des arguments génétiques sur la possible contribution de ce gène dans la physiopathologie du trouble bipolaire. A l'image de la participation génétique dans ces maladies complexes, c'est la combinaison des variations rares et fréquentes qui expliquent l'aspect génétique dans la transmission héréditaire de la maladie. Malgré tout, comme nos résultats le démontrent, chaque combinaison génétique est unique induisant une variabilité clinique de la maladie. Dès lors, pour appréhender l'aspect génétique du trouble, je pense qu'il serait intéressant de réaliser des études croisées afin d'étudier la combinaison de variations dans *CADPS* (en tant que variations rares) avec un autre gène candidat, comparé à des associations seules avec un ou plusieurs gènes candidats associés de manière significative dans la population, pour estimer le risque de prévalence de la maladie.

Nos études fonctionnelles renforcent l'hypothèse mécanistique du trouble.

Les mécanismes moléculaires liés aux phénotypes maniaques ou dépressifs sont plus ou moins compris sans pour autant permettre de récapituler l'ensemble de la maladie ou d'en expliquer sa survenue. En effet, des drogues ou des médicaments permettent de mimer des états pathologiques ou modifier nos humeurs. La régulation de l'exocytose des neurotransmetteurs est le mécanisme clé dans la régulation de nos émotions. La protéine *CADPS* bien que peu étudiée est un acteur de la régulation de l'exocytose calcium-dépendante.

Nous avons montré que des mutations non synonymes dans *CADPS* retrouvées chez des patients atteints d'un trouble bipolaire à début précoce perturbaient sa fonction. Malgré tout, les cibles thérapeutiques des thymorégulateurs, antidépresseurs ou neuroleptiques ne se concentrent pas sur *CADPS*. En effet, cette protéine intervient dans le remplissage ou la maintenance en catécholamines des vésicules synaptiques, et par conséquent sur la sécrétion de ces molécules. Mais son rôle précis dans ce mécanisme physiologique n'est pas encore clarifié. Même si, le but de ma thèse ne fut pas de répondre à cette question, on peut tout de même s'interroger sur la place de cette protéine dans ce schéma pour pouvoir par la suite discuter de sa place dans le trouble bipolaire.

Ainsi, je ne pense pas que cette protéine ait un rôle spécifique dans l'exocytose des LDCV ou des catécholamines, car il a été démontré que cette protéine était présente dans toute les synapses, dont la plupart ne secrètent pas de catécholamines et même dans le foie où l'exocytose n'est pas dépendante du calcium (Speidel et al. 2003).

De plus, je ne pense pas que cette protéine ait un rôle fondamentale dans la fusion ou la stabilisation des vésicules synaptiques, car le nombre et/ou la forme des vésicules ne sont pas altérées dans des neurones de souris privés de *CAPS*, malgré une diminution du RRP (Speidel et al. 2005). Mais un rôle en amont, dans l'amorçage de l'exocytose des vésicules, car son activité est dépendante d'une concentration lente en calcium et son inhibition n'altère pas l'exocytose si elle succède l'injection de calcium (Grishanin et al. 2004).

On peut alors se demander comment une même protéine peut avoir une action sur le remplissage mais aussi sur l'amorçage de l'exocytose des vésicules ?

On peut émettre l'hypothèse que *CADPS* aurait un rôle dans le mécanisme de *kiss and run* (Ceccarelli, Hurlbut, and Mauro 1973) faisant intervenir à la fois l'exocytose des vésicules et le recyclage rapide de celles-ci pour être rechargées. Ce mécanisme d'adaptation cellulaire, permet une libération modérée mais répétée, à intervalle court, de neurotransmetteurs à la synapse. Contrairement à la fusion complète des vésicules synaptiques qui fait appel à une endocytose membranaire pour reformer une vésicule, le mécanisme de *kiss and run* prévoit une exocytose partielle de neurotransmetteurs puis la réutilisation rapide de la même vésicule pour former un nouveau pore de fusion (Figure III. 2). En effet, il est possible de visualiser ce mécanisme de fusion vésiculaire grâce à une protéine vésiculaire chimérique fluorescente dépendante du pH, comme la synaptophluorine. Après la stimulation d'une terminaison synaptique, on peut suivre

par réflexion totale de la fluorescence interne (TIRF) la libération de neurotransmetteurs corrélée à la libération de protons à la synapse. Dans le cadre du *kiss and run* la fluorescence des vésicules observées est brève mais répétée, contrairement à la fusion complète qui augmente dans le temps (Stevens and Williams 2000). Il a récemment été montré grâce à cette technologie que lors d'une stimulation cellulaire (56 ou 96nM KCl), il n'y a pas de changement du nombre de molécules CAPS à la surface cellulaire (9 molécules/cluster de DCV) contrairement au BDNF dont l'intensité de fluorescence augmente au cours du temps. De plus, l'extinction de CAPS grâce à des micro-ARN, conduit à une réduction drastique (40%) du nombre de vésicules les plus fortement liées à la surface cellulaire (≥ 28 nm de la membrane) sans affecter les autres pools, tout comme l'extinction de VAMP-2 (Kabachinski et al. 2016). Enfin, il a déjà été suggéré grâce à des techniques électrophysiologiques que CAPS interviendrait spécifiquement dans la formation en *trans* du complexe SNARE pour l'exocytose ultra-rapide des neurotransmetteurs (1-30ms) (Jockusch et al. 2007). Ainsi, de part le mode d'action (révélé par TIRF ou les études électrophysiologiques), la localisation de cette protéine et sa constance numérique, on peut penser que CADPS serait à l'image du mécanisme de *kiss and run* révélé grâce à la synaptophluorine. Il serait ainsi intéressant de tester le comportement de la synaptophluorine, du FM1-43 (Pyle et al. 1999), ou de nanoparticules fluorescentes (Zhang, Li, and Tsien 2009) en absence de CAPS, pour observer si les mécanismes de *kiss and run* ou de fusion complète sont altérés.

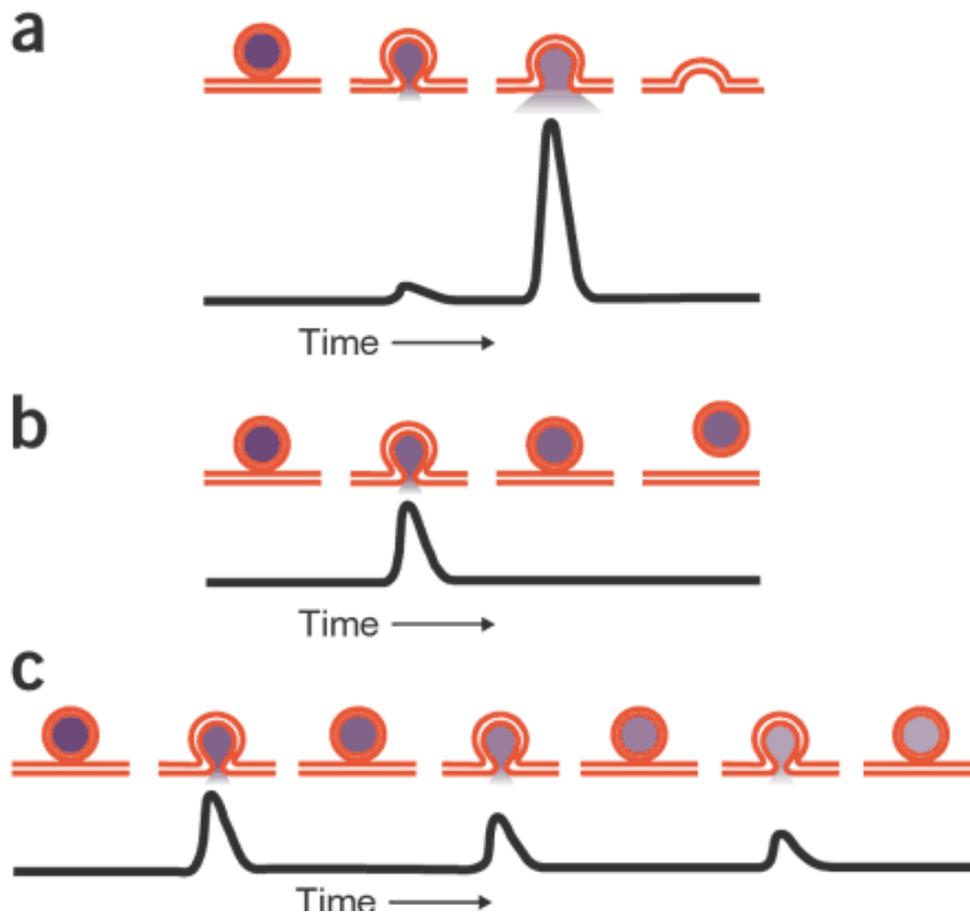


Figure III. 2. Mécanismes de fusion des vésicules synaptiques. (Wightman and Haynes 2004).

Schématisation du mécanisme (au dessus) et des courants ampérométriques (au dessous). (a) Fusion complète des vésicules après avoir formé un pore de fusion. Après la sécrétion, la vésicule est temporairement ajoutée à la membrane plasmique. (b) Un simple phénomène de *kiss and run*. (c) Un mécanisme complexe de *kiss and run* avec trois libérations partielles décroissantes.

Dans le cadre des maladies neuropsychiatriques, les mécanismes d'exocytose de neurotransmetteurs sont évidemment au cœur de ces dysfonctionnements. On pourrait citer un grand nombre de protéines associées à ces maladies comme, l'alpha synucléine, protéine chaperonne de la formation du complexe SNARE, impliquée dans des maladies neurodégénératives (Burré et al. 2010), ou la protéine Munc18-1 retrouvée fréquemment mutée dans le syndrome d'Ohtahara (Saitsu et al. 2008), ou enfin le grand nombre de mutations retrouvées dans des gènes codant pour des protéines synaptiques (Südhof 2008) et du complexe SNARE (Tableau III.I, Cupertino et al. 2016) chez des patients atteints des maladies psychiatriques. Néanmoins, peu d'études d'association génétiques à grande échelle ont impliqué ces gènes avec ces maladies. Seules des études ciblées, sur des gènes *a priori* candidats ont permis d'associer des SNP avec des différences d'expression de protéines sur des cerveaux *post-mortem* (Etain et al. 2010, Fatemi et al. 2001). De plus, d'un point de vue pharmacogénétique, on peut noter que l'administration de différents médicaments fréquemment utilisés en psychiatrie ont un effet indirect sur l'expression des protéines du complexe SNARE. Par exemple, des psychostimulants comme le méthylphénidate ou les amphétamines diminuent l'expression des transcrits de *Syt1*, *Syt4*, *Stx1a* dans des cellules PC-12 (Bartl et al. 2010), ou des traitements antipsychotiques comme, l'halopéridol, la chlorzapine ou la chlorpromazine, altèrent l'expression région spécifique des protéines du complexe SNARE dans des cerveaux de rats (Barr et al. 2006; Barakauskas et al. 2010; Sommer et al. 2010). Enfin des traitements antidépresseurs comme l'imipramine ou la sertraline, augmentent l'expression de la protéine VAMP2 dans le cortex frontal de rat (Yamada et al. 2002).

Aux vues de ces résultats divergents, entre d'une part l'importance physiologique de ce mécanisme ainsi que l'action indirecte des molécules sur celui-ci et d'autre part le peu d'associations génétiques et une cible thérapeutique non axée sur ce mécanisme de régulation, on peut s'interroger sur la place que peut représenter cette voie de signalisation dans le traitement des maladies neuropsychiatriques, dont les troubles bipolaires.

D'un point de vue pharmacologique, la cible de ces molécules est souvent extracellulaire au niveau de récepteurs neuronaux ou intracellulaire au niveau des transporteurs vésiculaires, pour agir sur la concentration en neurotransmetteurs par soucis d'efficacité et d'accessibilité. Or, ces traitements lourds pourraient probablement être améliorés

s'ils se concentraient sur des cibles cytoplasmiques intermédiaires, à l'exemple de la réserpine ou du lévétiracetam. Malgré tout, les interactions protéine-protéine entre les différents partenaires de ce complexe et l'omniprésence de ce mécanisme rend cette alternative peu envisageable avec des petites molécules, à l'exemple de la toxine botulique qui clive SNAP-25 et entraîne une paralysie généralisée. Ainsi, d'autres protéines synaptiques, comme CADPS qui est exprimée de manière spécifique dans le cerveau, pourraient être explorées en tant que cible thérapeutique pour moduler le taux de monoamines à la synapse (Lesch and Schmitt 2002).

Tableau III. 1. Association entre les gènes *SNAP25*, *VAMP1*, *VAMP2*, *STX1a*, *SYT1*, *SYT2* et les cinq maladies psychiatriques majeures. (Cupertino et al. 2016).

	Attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) children	Attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) adults	Autism spectrum disorders (ASD)	Major depressive disorder	Bipolar disorder	Schizophrenia
<i>SNAP25</i>	(+) Mill et al. (2002)	(-) Sánchez-Mora et al. (2013)	(-) Guerini et al. (2011)	(+) Kim et al. (2007) (in children with ADHD)	(+) Etain et al. (2010)	(-) Tachikawa et al. (2001)
	(+) Mill et al. (2005)	(-) Olgiati et al. (2014)	(-) Braidà et al. (2015)	(+) Wang et al. (2015)		(-) Kawashima et al. (2008)
	(+) Feng et al. (2005)	(+) Herken et al. (2014)				(+) Carroll et al. (2009)
	(-) Brookes et al. (2005)					(+) Fanous et al. (2010)
	(-) Brookes et al. (2006)					(+) Lochman et al. (2013)
	(+) Gizer et al. (2009)					(+) Dai et al. (2014)
	(n) Guan et al. (2009)					(+) Wang et al. (2015)
	(+) Forero et al. (2009)					
	(+) Zhang et al. (2011)					
	(+) Sarkar et al. (2012)					
	(-) Sánchez-Mora et al. (2013)					
	(+) Hawi et al. (2013)					
	(+) Gálvez et al. (2014)					
	(-) Gao et al. (2015)					
	<i>VAMP1</i>	(-) Sánchez-Mora et al. (2013)	(-) Sánchez-Mora et al. (2013)			
<i>VAMP2</i>	(-) Brookes et al. (2005)	(-) Sánchez-Mora et al. (2013)			(-) Jamra et al. (2008)	(-) Kawashima et al. (2008)
	(-) Brookes et al. (2006)	(+) Kenar et al. (2014)				
	(-) Sánchez-Mora et al. (2013)	(-) Gao et al. (2015)				
<i>STX1A</i>	(-) Brookes et al. (2005)	(+) Sánchez-Mora et al. (2013)	(n) Nakamura et al. (2008)			(+) Wong et al. (2004)
	(-) Brookes et al. (2006)	(+) Kenar et al. (2014)	(+) Durdiaková et al. (2014)			(-) Kawashima et al. (2008)
	(-) Guan et al. (2009)	(n) Olgiati et al. (2014)	(n) Nakamura et al. (2011)			(+) Mulle et al. (2014)
	(-) Sánchez-Mora et al. (2013)		(n) Malenfant et al. (2012)			
	(n) Gao et al. (2015)		(+) Tordjman et al. (2013)			
		(+) Roberts et al. (2014)				
<i>SYT1</i>	(-) Brookes et al. (2005)	(n) Sánchez-Mora et al. (2013)	(+) Szatmari et al. (2007)			
	(-) Brookes et al. (2006)					
	(n) Lasky-Su et al. (2008)					
	(n) Guan et al. (2009)					
	(n) Sánchez-Mora et al. (2013)					
<i>SYT2</i>	(+) Sánchez-Mora et al. (2013)	(-) Sánchez-Mora et al. (2013)				

Positive associations (+) with at least one polymorphism evaluated; (n) for nominal associations; and negative results (-) when no polymorphism was found associated

D'un point de vue clinique, les troubles bipolaires se définissent comme une addition de phases dépressives et maniaques dans une même pathologie. On peut penser que l'unité clinique ne serait donc pas le fruit d'un défaut lié à un mécanisme moléculaire, car il est peu probable d'avoir un seul mécanisme défaillant qui parfois serait suractivé et parfois inhibé, mais plutôt un problème d'homéostasie dans la quantité de monoamines présente à la synapse. Le tout est de savoir, qu'est ce qui régule cette homéostasie ? Quel est le « senseur » quantitatif qui permet de maintenir cet équilibre ?

On peut penser que la quantité de molécules présentes à la synapse est finement régulée et qu'elles interagissent dans ce but les unes avec les autres. En effet, la quantité de neurotransmetteurs présents à la synapse dépend de la concentration intracellulaire de sodium (pour déclencher un potentiel d'action) et de calcium (pour induire la fusion des vésicules synaptiques). Ainsi, un équilibre entre la quantité de neurotransmetteurs et de calcium extracellulaire peut s'opérer dans le but de maintenir un taux constant de neurotransmetteurs à la synapse. Dans le cas des troubles bipolaires, on peut penser que cette homéostasie n'est plus respectée du à des problèmes de régulation du calcium extra-synaptique. Avec cette hypothèse, la protéine CADPS, grâce à son action dépendante du calcium, pourrait avoir une implication dans les troubles bipolaires. En effet, les études préliminaires sur la synaptotagmine ont démontré qu'il existe une forme d'exocytose minoritaire, lente qui nécessite une forte affinité au calcium. La protéine CADPS qui a une affinité pour le calcium supérieure à la synaptotagmine ($K_d=270\mu\text{M}$) pourrait ainsi intervenir dans cette forme d'exocytose pour moduler le taux de neurotransmetteurs à la synapse de manière constante.

D'un point de vue moléculaire, la concentration en calcium extracellulaire est à peu près 10 fois supérieur à celle au niveau intracellulaire (100nM). Malgré tout, son transport passif est soumis à une forte régulation. En effet, la diversité des récepteurs calciques voltages dépendants sont témoins de cette spécificité. Dans le cadre des cellules neuronales, les récepteurs $\text{Ca}_{v2.1}$ et $\text{Ca}_{v2.2}$ permettent la régulation de l'entrée de calcium de part leur structure. Ainsi, le pore du récepteur formé par la sous-unité α_1 permet cette modulation par la liaison au niveau C-terminale (IM pour *IQ-calmodulin-binding motif* et CBD pour *Calmodulin Binding Domain*) de la calmoduline pour faciliter ou inhiber l'entrée de calcium. Aussi, la sous-unité β permet la régulation du nombre de récepteurs à la surface du neurone grâce à son motif de rétention au réticulum endoplasmique. Enfin, la sous-unité $\alpha_2-\delta$ permet de réguler le transport correcte vers la

terminaison axonale du pore α_1 , ainsi que sa proximité aux vésicules synaptiques (Hoppa et al. 2012). Tous ces mécanismes de régulation axés sur le récepteur membranaire démontrent l'importance de ce mécanisme d'homéostasie calcique. De fait, les gènes codant ces différentes sous-unités, dont particulièrement la sous-unité α_1 (*CACNA1*), ont été largement associés aux troubles bipolaires (Gershon et al. 2014). Malgré tout, cette forme de régulation ne permet pas d'expliquer l'équilibre qui peut s'opérer au niveau extracellulaire pour maintenir un taux plus ou moins constant de neurotransmetteurs à la synapse. Cette relation entre concentration ionique extracellulaire et taux de neurotransmetteurs synaptiques est pourtant nécessaire si les deux sont corrélés. En effet, les études de Del Castillo et Katz (Del Castillo and Katz 1954) puis de Jenkinson, démontrent qu'il existe une homéostasie des molécules synaptiques permettant de maintenir le taux d'acétyl-choline extracellulaire, grâce à une compétition antagoniste qui a lieu entre les taux de calcium et magnésium synaptiques (Jenkinson 1957). On peut ainsi penser qu'au niveau moléculaire, dans les troubles bipolaires, il existe un problème de balance entre le calcium et le magnésium extra-synaptique conduisant à une concentration calcique intracellulaire fluctuante et donc une quantité de neurotransmetteurs libérés variable.

Au niveau cellulaire, on peut parler du renforcement *hebbien* qui permet la consolidation d'une connexion synaptique si ces deux sont co-stimulés. Cette forme de plasticité synaptique entraînant un renforcement permanent à l'image de la potentialisation à long terme, ne prévoit donc pas de régulation. Or, il a été démontré qu'il existait une forme d'homéostasie synaptique qui, en réponse à une inhibition des courants excitateurs (TTX ou CNQX) ou à leur sur-activation (bicuculine), conduit les neurones à s'adapter pour maintenir une activation constante (Ramakers et al. 1994). Cette homéostasie synaptique est le fruit d'une nouvelle forme de plasticité synaptique où les courants (ou récepteurs post-synaptiques) ont la capacité d'échelonner, en proportion, leur activité (ou nombre) totale pour, d'une part, maintenir la *plasticité hebbienne* mais aussi la réguler en intensité (Figure III.3, Turrigiano 2008). Particulièrement, il a été montré que le BDNF était le médiateur de cette homéostasie synaptique. De fait, en présence de BDNF, il y a une modulation de l'activité neuronale en réponse à la TTX, et ceci, de manière opposée en fonction que le neurone soit excitateur ou inhibiteur (Rutherford, Nelson, and Turrigiano 1998). Or, nos résultats montrent qu'en présence d'un stress chronique, les souris hétérozygotes augmentent

leur niveau de BDNF plasmatique, alors qu'il est diminué pour les sauvages. Particulièrement, nous avons observé une corrélation positive entre la quantité de BDNF et celle de cortisol plasmatique chez les souris hétérozygotes alors qu'elle n'existe pas chez les souris sauvages. On peut, dès-lors, penser qu'il s'agit d'un mécanisme d'adaptation au stress dans le but de maintenir cette homéostasie synaptique, puisque l'on sait que priver de CADPS, les courants excitateurs sont fortement réduits. Ainsi, il serait intéressant de mesurer les courants post-synaptiques excitateurs chez ces souris hétérozygotes stressées en comparaison aux sauvages, pour pouvoir corréler la mesure du BDNF aux phénomènes de gradation synaptique (*synaptic scaling*).

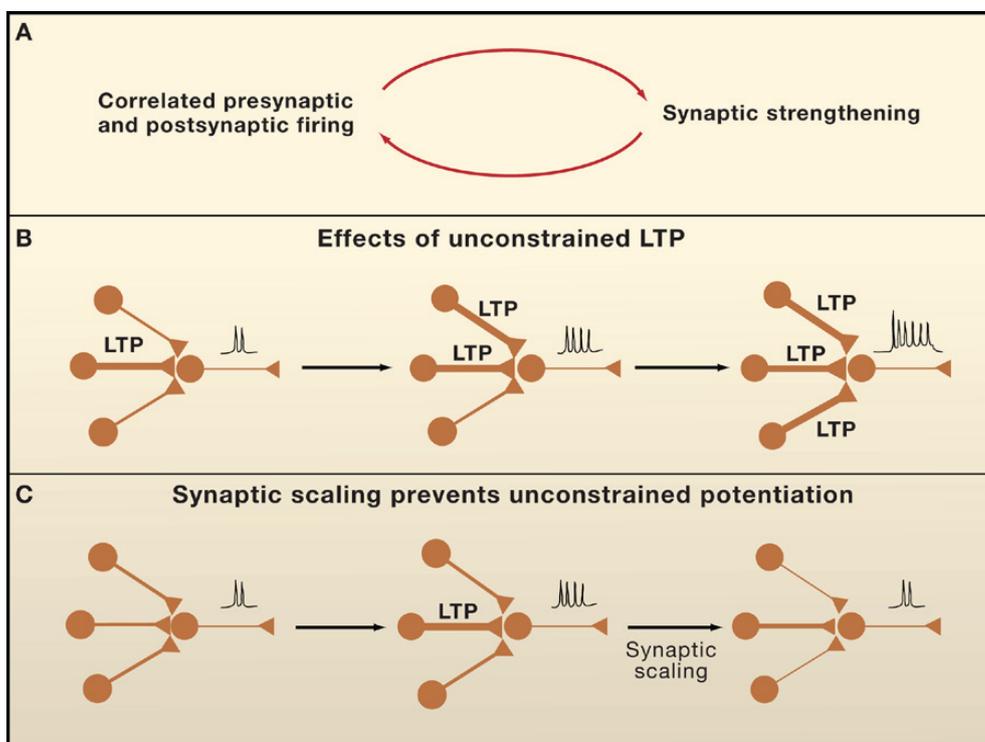


Figure III. 3. Les mécanismes de plasticité synaptique sont potentiellement déstabilisants. (Turrigiano 2008)

(A) La corrélation des excitations pré-synaptiques et post-synaptiques induit une potentialisation à long terme (LTP), ce qui permet au neurone pré-synaptique d'exciter le post-synaptique d'autant plus fort. Cette plasticité sous forme de LTP renforce leurs liens dans une boucle de régulation positive. (B) Une LTP non régulée va induire une perte de spécificité car quand un renforcement s'opère, il devient plus facile pour les autres connexions de se renforcer aussi. (C) L'homéostasie des connexions synaptiques par gradation, échelonnement (*synaptic scaling*) permet d'éviter cette perte de spécificité, car quand une LTP a lieu, la gradation synaptique va diminuer l'ensemble des connexions synaptiques jusqu'au retour initial. De plus la spécificité n'est pas perdue car la diminution se fait de manière constante pour normaliser l'intensité des connexions.

Nos études chez la souris peuvent en partie nous informer sur la fonction de ce gène.

Les comportements observés chez la souris ne peuvent, en aucun cas, récapituler la symptomatologie clinique observée chez les patients. En effet, aucun modèle murin ne peut à ce jour décrire des comportements maniaques et dépressifs entrecoupés de périodes de rémission euthymique. Malgré tout, des indices sur l'humeur de la souris peuvent être envisagés par le biais de tests comportementaux. Pour étudier l'impact du gène *CADPS* sur le comportement de la souris, des animaux transgéniques délétés des deux allèles du gène (*Caps1^{-/-}*) ont été générés mais ces derniers ne sont pas viables. Ce premier indice sur le caractère essentiel de ce gène, nous a donc contraint d'étudier des souris hétérozygotes (*Caps1^{+/-}*) avec des conclusions nuancées. Nos résultats démontrent que ces souris sont plus actives, réagissent différemment à l'anxiété et sont moins résignées que les souris sauvages. Outre ces observations faites sur le comportement des souris, les études biochimiques nous ont aussi montré des augmentations du niveau de cortisol et du BDNF après un stress appliqué aux souris *Caps1^{+/-}* comparé aux sauvages. Dès lors que l'expression des émotions n'est pas comprise chez la souris, les tests de comportements restent difficiles à interpréter et les conclusions doivent être nuancées. C'est pourquoi, l'interprétation de résultats « inversés » questionnant l'état dépressif de la souris *Caps1^{+/-}* par rapport à des souris sauvages, ne nous permettent pas de conclure sur un état moins déprimé ou un état maniaque de ces souris. Malgré tout, le caractère anxieux et hyperactif des souris *Caps1^{+/-}* observé par le biais des tests de comportements positifs et d'évaluations biochimiques renforce nos conclusions. L'anxiété et la réponse au stress étant des composantes environnementales majeures associées aux maladies psychiatriques, on peut penser que ce gène intervient dans cette boucle de régulation et permet de répondre de manière adéquate à un évènement stressant dans la libération de monoamines. Cependant, à l'image des autres modèles murins, aucun argument clair ne peut prédire que la souris délétée d'un allèle du gène *Cadps*, est spécifiquement un modèle de trouble bipolaire.

Après avoir discuté du rôle de CADPS grâce à mes résultats obtenus durant ma thèse, on peut dès-lors proposer une hypothèse mécanistique faisant intervenir cette protéine dans la physiopathologie du trouble bipolaire selon les paradigmes suivant :

1-L'activité de CADPS dépend de la concentration intracellulaire en calcium.

2-CADPS intervient dans le mécanisme de fusion *kiss and run*.

3-Le mécanisme de fusion *kiss and run* permet d'ajuster rapidement le taux de neurotransmetteurs à la synapse pour maintenir une homéostasie synaptique.

4-L'homéostasie synaptique est ce qui permet de réguler en partie l'humeur.

5-CADPS permet de moduler la réponse au stress pour maintenir une homéostasie synaptique.

Le stress en tant que toute déviation de l'homéostasie, permet une réponse adaptative du corps et joue un rôle crucial pour maintenir son fonctionnement (Walter Bradford Cannon 1967); mais il est aussi un facteur de risque fortement associé au développement de maladies neuropsychiatriques (Sousa 2016). En effet, des théories simplistes ont associé l'effet d'un stress chronique durant l'enfance (trouble de stress post-traumatique) au développement d'un trouble bipolaire (Rakofsky, Ressler, and Dunlop 2012), alors que de nouvelles théories prévoient qu'il peut être bénéfique en fonction du stress appliqué (McEwen et al. 2015). Quoi qu'il en soit, son impact peut s'observer au niveau moléculaire, cellulaire et systémique (de Kloet, Joëls, and Holsboer 2005).

Ainsi, l'axe hypothalamo-hypophysaire-surrénalien permet, entre autre, de réguler la réponse au stress *via* la production de glucocorticoïdes au niveau des glandes surrénales. Une boucle de régulation permet de moduler sa production par un rétrocontrôle négatif au niveau de l'hippocampe (Figure III.4a axe en rouge). Mais d'autres études ont montré qu'une augmentation du taux de glucocorticoïdes initiée par un stress chronique induisait une augmentation du facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF) (McMillan et al. 2004; Groves 2007 ; Takei et al. 2011; Gray et al. 2014), suggérant un mécanisme de compensation bénéfique du stress sur la croissance et la différenciation de nouveaux neurones (Figure III.4 a axe pointillé noir) .

La protéine CADPS qui est exprimée dans l'hippocampe ainsi que dans les glandes surrénales, est impliquée dans la sécrétion de BDNF (Eckenstaler, Lessmann, and Brigadski 2016), de glutamate et de monoamines au niveau de l'hippocampe (Jockusch

et al. 2007). Contrairement aux souris contrôles, nos résultats montrent que chez les souris *Caps 1^{+/-}* ayant subies un stress chronique :

-Le taux de cortisol sérique ne cesse d'augmenter en phase de rémission (S3), suggérant que cette protéine permet de moduler la sécrétion de cortisol pour maintenir une homéostasie synaptique (Figure III.4 c).

-Le taux de cortisol sérique est positivement corrélé au taux de BDNF hippocampique, du fait de la levée d'inhibition de sécrétion de cortisol.

La cascade de signalisation du calcium intracellulaire qui intervient dans l'exocytose de neurotransmetteurs (pré-synaptique) et la transcription de gènes dépendants du facteur CREB, est fortement impliquée dans le contrôle de l'humeur et donc dans l'étiopathologie du trouble bipolaire (Michael J. Berridge 2014). L'homéostasie synaptique modulée par les récepteurs calcium voltage dépendant au niveau pré-synaptique n'est plus maintenue sans CADPS, du fait des problèmes d'exocytose de monoamines.

Au niveau post-synaptique, nous n'avons aucun élément pour comprendre les conséquences fonctionnelles des modifications (pré-synaptiques) de l'activité de la protéine CADPS, sur les voies de signalisation pour la transduction du signal. Malgré tout, un grand nombre d'arguments moléculaires peuvent converger vers l'implication de cette protéine dans l'étiologie d'un trouble bipolaire :

-En effet la régulation du taux de glutamate, noradrénaline, sérotonine à la synapse qui est impliquée dans cette pathologie, utilise différentes voies de signalisation au niveau post-synaptique pour transduire l'information. Sur la base de l'action du lithium dans le trouble bipolaire et de la connaissance des voies de signalisation, on peut penser que dans cette pathologie il y a une surproduction d'inositol triphosphate (IP₃) qui conduit à une dérégulation de l'homéostasie calcique au niveau du réticulum endoplasmique et des canaux de type L voltage dépendant, pour exciter le neurone : *inositol depletion hypothesis* (M. J. Berridge, Downes, and Hanley 1982).

-Aussi, la neurogenèse, qui est responsable de la génération, la différenciation et survie de nouveaux neurones, est nécessaire au maintien de l'architecture cérébrale. Le trouble bipolaire peut s'expliquer par un déclin dans la quantité de neurotrophines comme le BDNF produit par des neurones excitateurs, perturbant la balance excitatrice/inhibitrice. Les patients souffrant de dépression ont un taux de BDNF

sérique diminué (Liu et al. 2008), mais aucun argument ne permet d'extrapoler sur les phases maniaques de la pathologie.

Donc, la réduction de l'activité excitatrice globale couplée à l'hyper production d'IP₃ a pour conséquence une diminution de l'ouverture des canaux calciques voltages dépendants qui jouent un rôle central dans la régulation de l'activité transcriptionnelle Ca²⁺ - dépendante du facteur CREB (Annexe III).

On peut penser aux vues des résultats moléculaires et comportementaux que ce modèle de souris hétérozygotes décrirait une forme d'exaltation de l'humeur avec de l'hyperactivité et une réponse au stress inappropriée. Pour cela, il serait intéressant de tester au niveau moléculaire l'expression post-synaptique des protéines de la cascade de signalisation impliquées dans la régulation des émotions (AMPC, GSK3-β, phosphorylation du facteur CREB) en présence ou non d'un traitement au lithium.

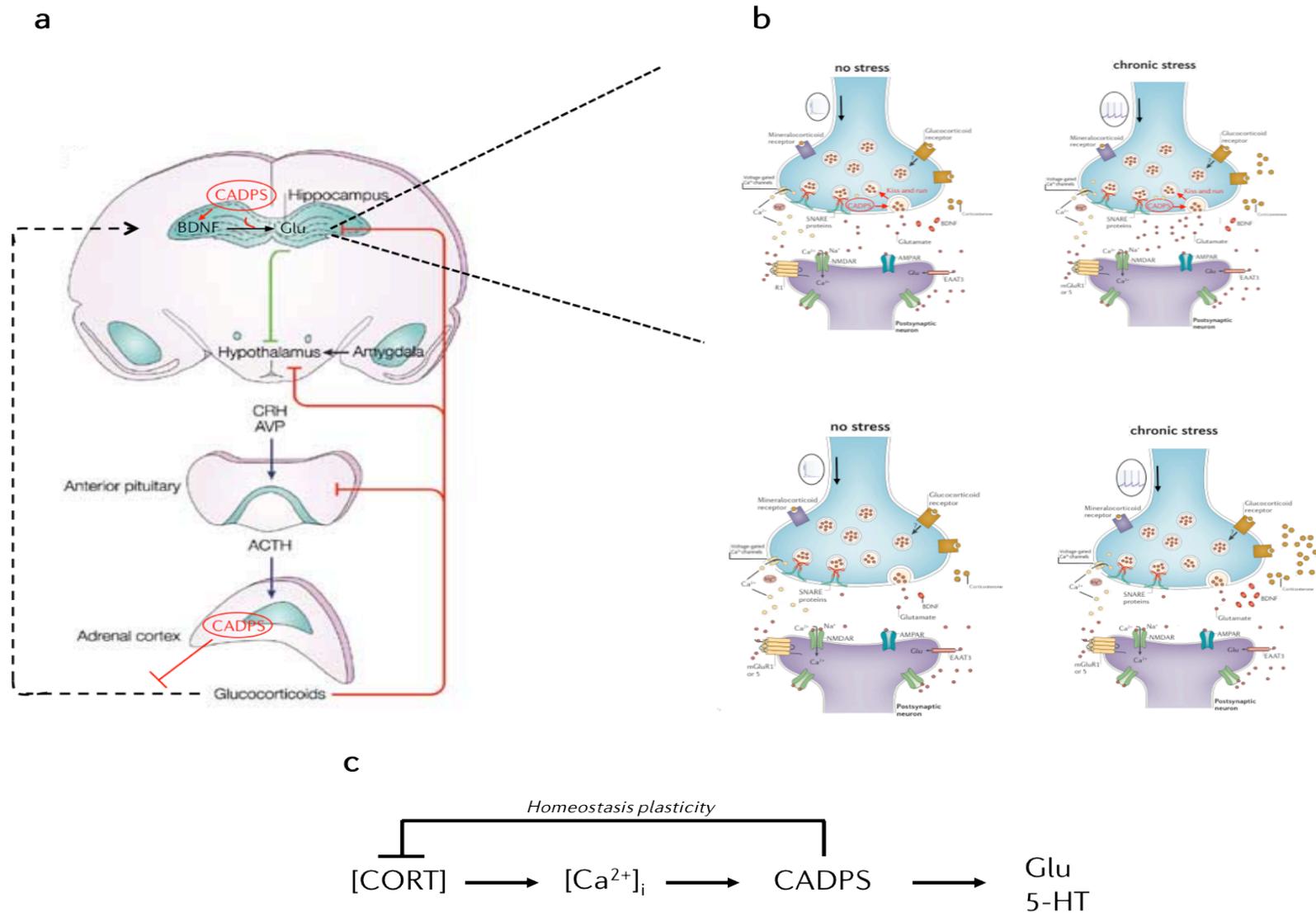


Figure III. 4. Modèle expliquant le mécanisme d'action de CADPS dans la réponse au stress.

(a) Au niveau systémique, la sécrétion de glutamate conduit à une inhibition de l'axe HPA, qui est potentialisé par un rétrocontrôle négatif des glucocorticoïdes sur l'hippocampe et inhibé par l'action de CADPS sur la sécrétion de BDNF et glutamate. Sans CADPS, l'inhibition est levée et le taux de corticostérone augmente fortement, un mécanisme de compensation fait probablement intervenir le BDNF pour le moduler. (b) Au niveau cellulaire, le stress induit une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire pour augmenter la sécrétion de glutamate. (c) Equation chimique faisant intervenir CADPS dans l'homéostasie synaptique

En conclusion, par rapport à la question initialement posée, à savoir si le gène *CADPS* pouvait jouer un rôle dans la physiopathologie du trouble bipolaire, certaines réponses ont pu être apportées.

Ainsi, je pense que, durant ma thèse un grand nombre de d'arguments suggèrent pour la première fois que la protéine CADPS pourrait être impliquée dans une affection psychiatrique. Ces données confirment que le trouble bipolaire, ou du moins, une partie des phénotypes observés chez certains patients, pourrait correspondre à un défaut dans la sécrétion calcium dépendante de monoamines, lors d'évènements stressant.

Ces données ouvrent de nouvelles voies d'exploration et proposent un nouveau gène synaptique qui pourrait contribuer à la prédisposition à cette maladie. Cependant, la complexité de la maladie nous conduit inéluctablement à s'ouvrir sur d'autres approches moins ciblées d'un point de vue génétique et clinique. C'est pourquoi nous envisageons de réaliser un séquençage à haut débit pour le gène *CADPS* dans une cohorte de patients atteints de schizophrénie, dans le but de répondre à ces questions de spécificité. De plus, ces maladies chroniques peuvent être vues comme une affection globale de l'organisme. La vision neuro-essentialiste de ces affections est débattue à la vue des comorbidités et des infections associées à ces maladies. Par exemple, les patients avec un trouble bipolaire ont deux fois plus de risques de développer un diabète de type II que dans la population générale (Vancampfort et al. 2015), alors que les cellules β pancréatiques des souris *Caps1^{+/-}* contiennent et secrètent moins d'insuline que les souris sauvages (Speidel et al. 2008). Ainsi, de nouveaux champs de recherche s'intéressant au métabolisme, à l'immuno-psychiatrie (Marion Leboyer et al. 2016) ou à la modélisation environnementale par le biais des mathématiques, voient le jour pour tenter de comprendre ces pathologies mentales. En effet, des nouvelles approches ont permis de réfléchir sur l'impact du microbiote intestinal (Rogers et al. 2016), des infections virales (Oliveira et al. 2016; Perron et al. 2012) ou même du mois de naissance saisonnier pour influencer la survenue de cette pathologie (Bauer et al. 2015).

Toutes ces connaissances propositionnelles, cultivées, expérimentées durant cette thèse nous auront permis d'enrichir notre savoir dans une démarche positiviste, comme l'énonçait Claude Bernard dans son *Introduction à l'étude de la médecine expérimentale* : « *l'expérience est toujours acquise en vertu d'un raisonnement précis établi sur une idée qu'a fait naître l'observation et que contrôle l'expérience* » (Bernard 1865) qui trouvera son essor tant au niveau scientifique que personnel.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abrahams, Brett S., and Daniel H. Geschwind. 2008. "Advances in Autism Genetics: On the Threshold of a New Neurobiology." *Nature Reviews. Genetics* 9 (5): 341–55. doi:10.1038/nrg2346.

Alfonso, A., K. Grundahl, J. S. Duerr, H. P. Han, and J. B. Rand. 1993. "The *Caenorhabditis Elegans* Unc-17 Gene: A Putative Vesicular Acetylcholine Transporter." *Science* 261 (5121): 617–19. doi:10.1126/science.8342028.

Alfonso, Julieta, Luciana R. Frick, Dafne M. Silberman, María L. Palumbo, Ana M. Genaro, and Alberto C. Frasch. 2006. "Regulation of Hippocampal Gene Expression Is Conserved in Two Species Subjected to Different Stressors and Antidepressant Treatments." *Biological Psychiatry* 59 (3): 244–51. doi:10.1016/j.biopsych.2005.06.036.

American Psychiatric Association. 2013. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders: Dsm-5*. Amer Psychiatric Pub Incorporated.

Ann, K., J. A. Kowalchuk, K. M. Loyet, and T. F. Martin. 1997. "Novel Ca²⁺-Binding Protein (CAPS) Related to UNC-31 Required for Ca²⁺-Activated Exocytosis." *The Journal of Biological Chemistry* 272 (32): 19637–40.

Arétée de Cappadoce. n.d. "De La Manie." In *Traité Des Signes, Des Causes et Cures Des Maladies Aiguës et Chroniques*. Vol. Lib.III, ch.V.

Augustin, I., C. Rosenmund, T. C. Südhof, and N. Brose. 1999. "Munc13-1 Is Essential for Fusion Competence of Glutamatergic Synaptic Vesicles." *Nature* 400 (6743): 457–61. doi:10.1038/22768.

Aupperle, Robin L., and Martin P. Paulus. 2010. "Neural Systems Underlying Approach and Avoidance in Anxiety Disorders." *Dialogues in Clinical Neuroscience* 12 (4): 517–31.

Avery, L., C. I. Bargmann, and H. R. Horvitz. 1993. "The *Caenorhabditis Elegans* Unc-31 Gene Affects Multiple Nervous System-Controlled Functions." *Genetics* 134 (2): 455–64.

Baastrup, P. C., J. C. Poulsen, M. Schou, K. Thomsen, and A. Amdisen. 1970. "Prophylactic Lithium: Double Blind Discontinuation in Manic-Depressive and Recurrent-Depressive Disorders." *Lancet (London, England)* 2 (7668): 326–30.

Badner, J. A., D. Koller, T. Foroud, H. Edenberg, J. I. Nurnberger, P. P. Zandi, V. L. Willour, et al. 2012. "Genome-Wide Linkage Analysis of 972 Bipolar Pedigrees Using Single-Nucleotide Polymorphisms." *Molecular Psychiatry* 17 (8): 818–26. doi:10.1038/mp.2011.89.

Barakauskas, Vilte E., Clare L. Beasley, Alasdair M. Barr, Athena R. Ypsilanti, Hong-Ying Li, Allen E. Thornton, Hubert Wong, et al. 2010. "A Novel Mechanism and Treatment Target for Presynaptic Abnormalities in Specific Striatal Regions in Schizophrenia." *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 35 (5): 1226–38. doi:10.1038/npp.2009.228.

Bard, P. 1928. "A Diencephalic Mechanism for the Expression of Rage with Special Reference to the Sympathetic Nervous System." *American Journal of Physiology* 84: 490–515.

Barnes, Nicholas M., Tim G. Hales, Sarah C. R. Lummis, and John A. Peters. 2009. "The 5-HT₃ Receptor--the Relationship between Structure and Function." *Neuropharmacology* 56 (1): 273–84. doi:10.1016/j.neuropharm.2008.08.003.

Barr, Alasdair M., Clint E. Young, Anthony G. Phillips, and William G. Honer. 2006. "Selective Effects of Typical Antipsychotic Drugs on SNAP-25 and Synaptophysin in the Hippocampal Trisynaptic Pathway." *The International Journal of Neuropsychopharmacology / Official Scientific Journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)* 9 (4): 457–63. doi:10.1017/S1461145705006000.

Bartl, Jasmin, Pille Link, Corinna Schlosser, Manfred Gerlach, Angelika Schmitt, Susanne Walitza, Peter Riederer, and Edna Grünblatt. 2010. "Effects of Methylphenidate: The Cellular Point of View." *Attention Deficit and Hyperactivity Disorders* 2 (4): 225–32. doi:10.1007/s12402-010-0039-6.

Basu, Jayeeta, Nan Shen, Irina Dulubova, Jun Lu, Rong Guan, Oleg Guryev, Nick V. Grishin, Christian Rosenmund, and Josep Rizo. 2005. "A Minimal Domain Responsible for Munc13 Activity." *Nature Structural & Molecular Biology* 12 (11): 1017–18. doi:10.1038/nsmb1001.

Bauer, Michael, Tasha Glenn, Martin Alda, Ole A. Andreassen, Elias Angelopoulos, Raffaella Ardu, Christopher Baethge, et al. 2015. "Influence of Light Exposure during Early Life on the Age of Onset of Bipolar Disorder." *Journal of Psychiatric Research* 64 (May): 1–8. doi:10.1016/j.jpsychires.2015.03.013.

Bellivier, Frank, Bruno Etain, Alain Malafosse, Chantal Henry, Jean-Pierre Kahn, Orly Elgrabli-Wajsbrodt, Stéphane Jamain, et al. 2014. "Age at Onset in Bipolar I Affective Disorder in the USA and Europe." *The World Journal of Biological Psychiatry: The Official Journal of the World Federation of Societies of Biological Psychiatry* 15 (5): 369–76. doi:10.3109/15622975.2011.639801.

Bellivier, Frank, Jean-Louis Golmard, Marcella Rietschel, Thomas G. Schulze, Alain Malafosse, Martin Preisig, Patrick McKeon, Lesley Mynett-Johnson, Chantal Henry, and Marion Leboyer. 2003. "Age at Onset in Bipolar I Affective Disorder: Further Evidence for Three Subgroups." *The American Journal of Psychiatry* 160 (5): 999–1001. doi:10.1176/appi.ajp.160.5.999.

Belmaker, R. H. 2004. "Bipolar Disorder." *The New England Journal of Medicine* 351 (5): 476–86. doi:10.1056/NEJMra035354.

Belmonte Mahon, Pamela, Mehdi Pirooznia, Fernando S. Goes, Fayaz Seifuddin, Jo Steele, Phil Hyoun Lee, Jie Huang, et al. 2011. "Genome-Wide Association Analysis of Age at Onset and Psychotic Symptoms in Bipolar Disorder." *American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics: The Official Publication of the International Society of Psychiatric Genetics* 156B (3): 370–78. doi:10.1002/ajmg.b.31172.

Bernard, Claude. 1865. *Introduction à l'étude de la médecine expérimentale*. J. B. Baillière et fils.

Berridge, Michael J. 2013. "Dysregulation of Neural Calcium Signaling in Alzheimer Disease, Bipolar Disorder and Schizophrenia." *Prion* 7 (1): 2–13. doi:10.4161/pri.21767.

———. 2014. "Calcium Signalling and Psychiatric Disease: Bipolar Disorder and Schizophrenia." *Cell and Tissue Research* 357 (2): 477–92. doi:10.1007/s00441-014-1806-z.

Berridge, M. J., C. P. Downes, and M. R. Hanley. 1982. "Lithium Amplifies Agonist-Dependent Phosphatidylinositol Responses in Brain and Salivary Glands." *The Biochemical Journal* 206 (3): 587–95.

Berwin, B., E. Floor, and T. F. Martin. 1998. "CAPS (mammalian UNC-31) Protein Localizes to Membranes Involved in Dense-Core Vesicle Exocytosis." *Neuron* 21 (1): 137–45.

Binda, Alicia V., Nadine Kabbani, and Robert Levenson. 2005. "Regulation of Dense Core Vesicle Release from PC12 Cells by Interaction between the D2 Dopamine Receptor and Calcium-Dependent Activator Protein for Secretion (CAPS)." *Biochemical Pharmacology* 69 (10): 1451–61. doi:10.1016/j.bcp.2005.02.015.

Blasi, J, E R Chapman, S Yamasaki, T Binz, H Niemann, and R Jahn. 1993. "Botulinum Neurotoxin C1 Blocks Neurotransmitter Release by Means of Cleaving HPC-1/syntaxin." *The EMBO Journal* 12 (12): 4821–28.

Blasi, Juan, Edwin R. Chapman, Egenhard Link, Thomas Binz, Shinji Yamasaki, Pietro De Camilli, Thomas C. Südhof, Heiner Niemann, and Reinhard Jahn. 1993. "Botulinum Neurotoxin A Selectively Cleaves the Synaptic Protein SNAP-25." *Nature* 365 (6442): 160–63. doi:10.1038/365160a0.

Bleuler, Eugen. 1911. *Dementia praecox, oder Gruppe der Schizophrenien*. Leipzig: Deuticke.

Brenner, S. 1974. "The Genetics of *Caenorhabditis Elegans*." *Genetics* 77 (1): 71–94.

Brodie, B. B., P. A. Shore, and S. L. Silver. 1955. "Potentiating Action of Chlorpromazine and Reserpine." *Nature* 175 (4469): 1133–34.

Brodmann. 1909. *Vergleichende Lokalisationslehre Der Grosshirnrinde in Ihren Prinzipien Dargestellt Auf Grund Des Zeelenbaues*. Leipzig: Barth.

Brunk, Irene, Christian Blex, Dina Speidel, Nils Brose, and Gudrun Ahnert-Hilger. 2009. "Ca²⁺-Dependent Activator Proteins of Secretion Promote Vesicular Monoamine Uptake." *The Journal of Biological Chemistry* 284 (2): 1050–56. doi:10.1074/jbc.M805328200.

- Burgoyne, Robert D., and Alan Morgan. 2003. "Secretory Granule Exocytosis." *Physiological Reviews* 83 (2): 581–632. doi:10.1152/physrev.00031.2002.
- Burré, Jacqueline, Manu Sharma, Theodoros Tsetsenis, Vladimir Buchman, Mark R. Etherton, and Thomas C. Südhof. 2010. "Alpha-Synuclein Promotes SNARE-Complex Assembly in Vivo and in Vitro." *Science (New York, N.Y.)* 329 (5999): 1663–67. doi:10.1126/science.1195227.
- Cannon, Walter Bradford. 1967. *The Wisdom of the Body*. Norton.
- Cannon, W. B. 1987. "The James-Lange Theory of Emotions: A Critical Examination and an Alternative Theory. By Walter B. Cannon, 1927." *The American Journal of Psychology* 100 (3-4): 567–86.
- Ceccarelli, B., W. P. Hurlbut, and A. Mauro. 1973. "Turnover of Transmitter and Synaptic Vesicles at the Frog Neuromuscular Junction." *The Journal of Cell Biology* 57 (2): 499–524.
- Chen, G., I. D. Henter, and H. K. Manji. 2010. "Translational Research in Bipolar Disorder: Emerging Insights from Genetically Based Models." *Molecular Psychiatry* 15 (9): 883–95. doi:10.1038/mp.2010.3.
- Cho, H. J., I. Meira-Lima, Q. Cordeiro, L. Michelon, P. Sham, H. Vallada, and D. A. Collier. 2005. "Population-Based and Family-Based Studies on the Serotonin Transporter Gene Polymorphisms and Bipolar Disorder: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Molecular Psychiatry* 10 (8): 771–81. doi:10.1038/sj.mp.4001663.
- Cichon, Sven, Thomas W. Mühleisen, Franziska A. Degenhardt, Manuel Mattheisen, Xavier Miró, Jana Strohmaier, Michael Steffens, et al. 2011. "Genome-Wide Association Study Identifies Genetic Variation in Neurocan as a Susceptibility Factor for Bipolar Disorder." *American Journal of Human Genetics* 88 (3): 372–81. doi:10.1016/j.ajhg.2011.01.017.
- Cisternas, Felipe A., John B. Vincent, Stephen W. Scherer, and Peter N. Ray. 2003. "Cloning and Characterization of Human CADPS and CADPS2, New Members of the Ca²⁺-Dependent Activator for Secretion Protein Family." *Genomics* 81 (3): 279–91.
- Collier, D. A., G. Stöber, T. Li, A. Heils, M. Catalano, D. Di Bella, M. J. Arranz, et al. 1996. "A Novel Functional Polymorphism within the Promoter of the Serotonin Transporter Gene: Possible Role in Susceptibility to Affective Disorders." *Molecular Psychiatry* 1 (6): 453–60.
- Comte, Auguste. 1844. *Discours sur l'esprit positif*. Carilian-Goeury et V. Dalmont.
- Conti, Alana C., John F. Cryan, Ashutosh Dalvi, Irwin Lucki, and Julie A. Blendy. 2002. "cAMP Response Element-Binding Protein Is Essential for the Upregulation of Brain-Derived Neurotrophic Factor Transcription, but Not the Behavioral or Endocrine Responses to Antidepressant Drugs." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 22 (8): 3262–68. doi:20026293.

- Craddock, Nick, Michael C. O'Donovan, and Michael J. Owen. 2006. "Genes for Schizophrenia and Bipolar Disorder? Implications for Psychiatric Nosology." *Schizophrenia Bulletin* 32 (1): 9–16. doi:10.1093/schbul/sbj033.
- Craddock, N., and I. Jones. 1999. "Genetics of Bipolar Disorder." *Journal of Medical Genetics* 36 (8): 585–94.
- Craddock, N., M. C. O'Donovan, and M. J. Owen. 2005. "The Genetics of Schizophrenia and Bipolar Disorder: Dissecting Psychosis." *Journal of Medical Genetics* 42 (3): 193–204. doi:10.1136/jmg.2005.030718.
- Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics Consortium. 2013. "Identification of Risk Loci with Shared Effects on Five Major Psychiatric Disorders: A Genome-Wide Analysis." *Lancet (London, England)* 381 (9875): 1371–79. doi:10.1016/S0140-6736(12)62129-1.
- Crow, T. J. 1990. "The Continuum of Psychosis and Its Genetic Origins. The Sixty-Fifth Maudsley Lecture." *The British Journal of Psychiatry: The Journal of Mental Science* 156 (June): 788–97.
- Cupertino, Renata Basso, Djenifer B. Kappel, Cibele Edom Bandeira, Jaqueline Bohrer Schuch, Bruna Santos da Silva, Diana Müller, Claiton Henrique Dotto Bau, and Nina Roth Mota. 2016. "SNARE Complex in Developmental Psychiatry: Neurotransmitter Exocytosis and beyond." *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)*, February. doi:10.1007/s00702-016-1514-9.
- Daily, Neil J., Kristin L. Boswell, Declan J. James, and Thomas F. J. Martin. 2010. "Novel Interactions of CAPS (Ca²⁺-Dependent Activator Protein for Secretion) with the Three Neuronal SNARE Proteins Required for Vesicle Fusion." *The Journal of Biological Chemistry* 285 (46): 35320–29. doi:10.1074/jbc.M110.145169.
- Damasio, Antonio R. 1999. *The Feeling of What Happens: Body and Emotion in the Making of Consciousness*. Harcourt Incorporated.
- Dardennes, R., A. Lafuma, and S. Watkins. 1999. "[Prophylactic treatment of mood disorders: cost effectiveness analysis comparing lithium and carbamazepine]." *L'Encéphale* 25 (5): 391–400.
- Darwin, Charles. 1874. *L'expression des émotions chez l'homme et les animaux*. C. Reinwald.
- de Kloet, E. Ron, Marian Joëls, and Florian Holsboer. 2005a. "Stress and the Brain: From Adaptation to Disease." *Nature Reviews. Neuroscience* 6 (6): 463–75. doi:10.1038/nrn1683.
- . 2005b. "Stress and the Brain: From Adaptation to Disease." *Nature Reviews. Neuroscience* 6 (6): 463–75. doi:10.1038/nrn1683.

de Lara, Catalina Lopez, Iris Jaitovich-Groisman, Cristiana Cruceanu, Firoza Mamdani, Véronique Lebel, Volodymyr Yerko, Angus Beck, et al. 2010. "Implication of Synapse-Related Genes in Bipolar Disorder by Linkage and Gene Expression Analyses." *The International Journal of Neuropsychopharmacology / Official Scientific Journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)* 13 (10): 1397–1410. doi:10.1017/S1461145710000714.

Delay, Jean. 1961. *Les dérèglements de l'humeur*. Presses Universitaires de France.
Del Castillo, J., and B. Katz. 1954. "The Effect of Magnesium on the Activity of Motor Nerve Endings." *The Journal of Physiology* 124 (3): 553–59.

Descartes, René. 1651. *Les principes de la philosophie*. Chez Henry le Gras ... et Edme Pepingué.

Dictionnaire de médecine Flammarion (8^e Éd.) KERNBAUM Serge, Serge. 2008. "Dictionnaire de Médecine Flammarion (8^e Éd.) KERNBAUM Serge." *Librairie Lavoisier*. <http://www.lavoisier.fr/livre/medecine/dictionnaire-de-medecine-flammarion-8-ed/kernbaum/descriptif-9782257000323>.

Dictionnaire illustre des termes de médecine (30e édition) - Garnier M , Del. 2009. "Dictionnaire Illustre Des Termes de Médecine (30e édition) - Garnier M , Del." <http://www.chapitre.com/CHAPITRE/fr/BOOK/garnier-m-del/dictionnaire-illustre-des-termes-de-medecine-30e-edition,24671179.aspx>.

Dilsaver, Steven C. 2011. "An Estimate of the Minimum Economic Burden of Bipolar I and II Disorders in the United States: 2009." *Journal of Affective Disorders* 129 (1-3): 79–83. doi:10.1016/j.jad.2010.08.030.

Drancourt, N., B. Etain, M. Lajnef, C. Henry, A. Raust, B. Cochet, F. Mathieu, et al. 2013. "Duration of Untreated Bipolar Disorder: Missed Opportunities on the Long Road to Optimal Treatment." *Acta Psychiatrica Scandinavica* 127 (2): 136–44. doi:10.1111/j.1600-0447.2012.01917.x.

Dudbridge, Frank. 2008. "Likelihood-Based Association Analysis for Nuclear Families and Unrelated Subjects with Missing Genotype Data." *Human Heredity* 66 (2): 87–98. doi:10.1159/000119108.

Dulubova, I, S Sugita, S Hill, M Hosaka, I Fernandez, T C Südhof, and J Rizo. 1999. "A Conformational Switch in Syntaxin during Exocytosis: Role of munc18." *The EMBO Journal* 18 (16): 4372–82. doi:10.1093/emboj/18.16.4372.

Eckenstaler, Robert, Volkmar Lessmann, and Tanja Brigadski. 2016. "CAPS1 Effects on Intragranular pH and Regulation of BDNF Release from Secretory Granules in Hippocampal Neurons." *Journal of Cell Science* 129 (7): 1378–90. doi:10.1242/jcs.178251.

Esquirol, Etienne. 1838. *Des maladies mentales*. Tircher.

Essman, Walter B. 1979. *Serotonin in Health and Disease: Clinical Applications*. SP Books division of Spectrum Publications.

Etain, B., A. Dumaine, F. Mathieu, F. Chevalier, C. Henry, J.-P. Kahn, J. Deshommes, F. Bellivier, M. Leboyer, and S. Jamain. 2010. "A SNAP25 Promoter Variant Is Associated with Early-Onset Bipolar Disorder and a High Expression Level in Brain." *Molecular Psychiatry* 15 (7): 748–55. doi:10.1038/mp.2008.148.

Etain, B., F. Mathieu, M. Rietschel, W. Maier, M. Albus, P. McKeon, S. Roche, et al. 2006. "Genome-Wide Scan for Genes Involved in Bipolar Affective Disorder in 70 European Families Ascertained through a Bipolar Type I Early-Onset Proband: Supportive Evidence for Linkage at 3p14." *Molecular Psychiatry* 11 (7): 685–94. doi:10.1038/sj.mp.4001815.

Etain, Bruno, M. Lajnef, J. Loftus, C. Henry, A. Raust, S. Gard, J. P. Kahn, M. Leboyer, J. Scott, and F. Bellivier. 2016. "Association between Childhood Dimensions of Attention Deficit Hyperactivity Disorder and Adulthood Clinical Severity of Bipolar Disorders." *The Australian and New Zealand Journal of Psychiatry*, April. doi:10.1177/0004867416642021.

Farina, Margherita, Rhea van de Bospoort, Enqi He, Claudia M. Persoon, Jan R. T. van Weering, Jurjen H. Broeke, Matthijs Verhage, and Ruud F. Toonen. 2015. "CAPS-1 Promotes Fusion Competence of Stationary Dense-Core Vesicles in Presynaptic Terminals of Mammalian Neurons." *eLife* 4. doi:10.7554/eLife.05438.

Fatemi, S. H., J. A. Earle, J. M. Stry, S. Lee, and J. Sedgewick. 2001. "Altered Levels of the Synaptosomal Associated Protein SNAP-25 in Hippocampus of Subjects with Mood Disorders and Schizophrenia." *Neuroreport* 12 (15): 3257–62.

Flourens, M. J. P. 1824. *Recherches experimentales sur les proprietes et les fonctions du systeme nerveux: dans les animaux vertebres*. Crevot.

Foucault, Michel. 1979. *Histoire de la folie à l'âge classique*. Gallimard.

Fujita, Yoshihito, Ainan Xu, Li Xie, Lakshmanan Arunachalam, Ting-Chieh Chou, Tiandan Jiang, Soon-Kwang Chiew, et al. 2007. "Ca²⁺-Dependent Activator Protein for Secretion 1 Is Critical for Constitutive and Regulated Exocytosis but Not for Loading of Transmitters into Dense Core Vesicles." *The Journal of Biological Chemistry* 282 (29): 21392–403. doi:10.1074/jbc.M703699200.

Gall, Spurzheim. 1810. *Anatomie et Physiologie Du Système Nerveux En Général, et Du Cerveau En Particulier, Avec Des Observations Sur La Possibilité de Reconnoitre Plusieurs Dispositions Intellectuelles et Morales de l'Homme et Des Animaux, Par La Configuration de Leurs Tetes*. Schoell. Paris.

Geddes, John R., Sally Burgess, Keith Hawton, Kay Jamison, and Guy M. Goodwin. 2004. "Long-Term Lithium Therapy for Bipolar Disorder: Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials." *The American Journal of Psychiatry* 161 (2): 217–22. doi:10.1176/appi.ajp.161.2.217.

- Gershon, E. S., K. Grennan, J. Busnello, J. A. Badner, F. Ovsiew, S. Memon, N. Alliey-Rodriguez, J. Cooper, B. Romanos, and C. Liu. 2014. "A Rare Mutation of CACNA1C in a Patient with Bipolar Disorder, and Decreased Gene Expression Associated with a Bipolar-Associated Common SNP of CACNA1C in Brain." *Molecular Psychiatry* 19 (8): 890–94. doi:10.1038/mp.2013.107.
- Gershon, E. S., J. Hamovit, J. J. Guroff, E. Dibble, J. F. Leckman, W. Sceery, S. D. Targum, J. I. Nurnberger, L. R. Goldin, and W. E. Bunney. 1982. "A Family Study of Schizoaffective, Bipolar I, Bipolar II, Unipolar, and Normal Control Proband." *Archives of General Psychiatry* 39 (10): 1157–67.
- Geyer, M. A., K. L. McIlwain, and R. Paylor. 2002. "Mouse Genetic Models for Prepulse Inhibition: An Early Review." *Molecular Psychiatry* 7 (10): 1039–53. doi:10.1038/sj.mp.4001159.
- Gold, P. W., J. Licinio, M. L. Wong, and G. P. Chrousos. 1995. "Corticotropin Releasing Hormone in the Pathophysiology of Melancholic and Atypical Depression and in the Mechanism of Action of Antidepressant Drugs." *Annals of the New York Academy of Sciences* 771 (December): 716–29.
- Goodwin, Frederick K., and Kay Redfield Jamison. 2007. *Manic-Depressive Illness: Bipolar Disorders and Recurrent Depression*. Oxford University Press.
- Gray, J. D., and B. S. McEwen. 2013. "Lithium's Role in Neural Plasticity and Its Implications for Mood Disorders." *Acta Psychiatrica Scandinavica* 128 (5): 347–61. doi:10.1111/acps.12139.
- Gray, J. D., T. G. Rubin, R. G. Hunter, and B. S. McEwen. 2014. "Hippocampal Gene Expression Changes Underlying Stress Sensitization and Recovery." *Molecular Psychiatry* 19 (11): 1171–78. doi:10.1038/mp.2013.175.
- Grishanin, Ruslan N., Vadim A. Klenchin, Kelly M. Loyet, Judith A. Kowalchyk, Kyoungsook Ann, and Thomas F. J. Martin. 2002. "Membrane Association Domains in Ca²⁺-Dependent Activator Protein for Secretion Mediate Plasma Membrane and Dense-Core Vesicle Binding Required for Ca²⁺-Dependent Exocytosis." *The Journal of Biological Chemistry* 277 (24): 22025–34. doi:10.1074/jbc.M201614200.
- Grishanin, Ruslan N., Judith A. Kowalchyk, Vadim A. Klenchin, Kyoungsook Ann, Cynthia A. Earles, Edwin R. Chapman, Roy R. L. Gerona, and Thomas F. J. Martin. 2004. "CAPS Acts at a Prefusion Step in Dense-Core Vesicle Exocytosis as a PIP₂ Binding Protein." *Neuron* 43 (4): 551–62. doi:10.1016/j.neuron.2004.07.028.
- Group, Psychiatric GWAS Consortium Bipolar Disorder Working. 2011. "Large-Scale Genome-Wide Association Analysis of Bipolar Disorder Identifies a New Susceptibility Locus near ODZ4." *Nature Genetics* 43 (10): 977–83. doi:10.1038/ng.943.
- Groves, J. O. 2007. "Is It Time to Reassess the BDNF Hypothesis of Depression?" *Molecular Psychiatry* 12 (12): 1079–88. doi:10.1038/sj.mp.4002075.

Hamshere, Marian L., Katherine Gordon-Smith, Liz Forty, Lisa Jones, Sian Caesar, Christine Fraser, Sally Hyde, et al. 2009. "Age-at-Onset in Bipolar-I Disorder: Mixture Analysis of 1369 Cases Identifies Three Distinct Clinical Sub-Groups." *Journal of Affective Disorders* 116 (1-2): 23–29. doi:10.1016/j.jad.2008.10.021.

Hamshere, M. L., J. T. R. Walters, R. Smith, A. L. Richards, E. Green, D. Grozeva, I. Jones, et al. 2013. "Genome-Wide Significant Associations in Schizophrenia to ITIH3/4, CACNA1C and SDCCAG8, and Extensive Replication of Associations Reported by the Schizophrenia PGC." *Molecular Psychiatry* 18 (6): 708–12. doi:10.1038/mp.2012.67.

Hattori, Eiji, Chunyu Liu, Judith A. Badner, Tom I. Bonner, Susan L. Christian, Manjula Maheshwari, Sevilla D. Detera-Wadleigh, Richard A. Gibbs, and Elliot S. Gershon. 2003. "Polymorphisms at the G72/G30 Gene Locus, on 13q33, Are Associated with Bipolar Disorder in Two Independent Pedigree Series." *American Journal of Human Genetics* 72 (5): 1131–40. doi:10.1086/374822.

Hattori, Kotaro, Haruko Tanaka, Chisato Wakabayashi, Noriko Yamamoto, Hirofumi Uchiyama, Toshiya Teraishi, Hiroaki Hori, Kunimasa Arima, and Hiroshi Kunugi. 2011. "Expression of Ca²⁺-Dependent Activator Protein for Secretion 2 Is Increased in the Brains of Schizophrenic Patients." *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 35 (7): 1738–43. doi:10.1016/j.pnpbp.2011.05.004.

Hay, J. C., P. L. Fiset, G. H. Jenkins, K. Fukami, T. Takenawa, R. A. Anderson, and T. F. Martin. 1995. "ATP-Dependent Inositide Phosphorylation Required for Ca(2+)-Activated Secretion." *Nature* 374 (6518): 173–77. doi:10.1038/374173a0.

Hay, J. C., and T. F. Martin. 1993. "Phosphatidylinositol Transfer Protein Required for ATP-Dependent Priming of Ca(2+)-Activated Secretion." *Nature* 366 (6455): 572–75. doi:10.1038/366572a0.

Hegel, Georg Wilhelm Friedrich. 1970. In *Encyclopédie des sciences philosophiques: texte intégral*, 233–34. Libr. Philosophique Vrin.

Henningsen, Kim, Johan Palmfeldt, Sofie Christiansen, Isabel Baiges, Steffen Bak, Ole Nørregaard Jensen, Niels Gregersen, and Ove Wiborg. 2012. "Candidate Hippocampal Biomarkers of Susceptibility and Resilience to Stress in a Rat Model of Depression." *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 11 (7): M111.016428. doi:10.1074/mcp.M111.016428.

Hess, Walter Rudopf. 1954. *Diencephalon, Autonomic and Extrapyrmidal Functions*. Monographs in Biology and Medicine, v. 3. New York: Grune & Stratton. <http://catalog.hathitrust.org/Record/007938926>.

Hoppa, Michael B., Beatrice Lana, Wojciech Margas, Annette C. Dolphin, and Timothy A. Ryan. 2012. "α2δ Expression Sets Presynaptic Calcium Channel Abundance and Release Probability." *Nature* 486 (7401): 122–25. doi:10.1038/nature11033.

IMGSAC. 2001. "A Genomewide Screen for Autism: Strong Evidence for Linkage to Chromosomes 2q, 7q, and 16p." *The American Journal of Human Genetics* 69 (3): 570–81. doi:10.1086/323264.

International Schizophrenia Consortium, Shaun M. Purcell, Naomi R. Wray, Jennifer L. Stone, Peter M. Visscher, Michael C. O'Donovan, Patrick F. Sullivan, and Pamela Sklar. 2009. "Common Polygenic Variation Contributes to Risk of Schizophrenia and Bipolar Disorder." *Nature* 460 (7256): 748–52. doi:10.1038/nature08185.

Jahn, Reinhard, and Dirk Fasshauer. 2012. "Molecular Machines Governing Exocytosis of Synaptic Vesicles." *Nature* 490 (7419): 201–7. doi:10.1038/nature11320.

James, Declan J., Chuenchanok Khodthong, Judith A. Kowalchuk, and Thomas F. J. Martin. 2008. "Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate Regulates SNARE-Dependent Membrane Fusion." *The Journal of Cell Biology* 182 (2): 355–66. doi:10.1083/jcb.200801056.

James, Declan J., Judith Kowalchuk, Neil Daily, Matt Petrie, and Thomas F. J. Martin. 2009. "CAPS Drives Trans-SNARE Complex Formation and Membrane Fusion through Syntaxin Interactions." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (41): 17308–13. doi:10.1073/pnas.0900755106.

James, Robert J. 1748. In *Dictionnaire universel de médecine, de chirurgie, de chymie, de botanique, d'anatomie, de pharmacie, d'histoire naturelle, &c: précédé d'un discours historique sur l'origine et les progres de la médecine*, 1125. chez Briasson.

James, William. 1884. *What Is an Emotion?* Dartington College of Arts, Dept. of Theatre.
Jenkinson, D. H. 1957. "The Nature of the Antagonism between Calcium and Magnesium Ions at the Neuromuscular Junction." *The Journal of Physiology* 138 (3): 434–44.

Jockusch, Wolf J., Dina Speidel, Albrecht Sigler, Jakob B. Sørensen, Frederique Varoquaux, Jeong-Seop Rhee, and Nils Brose. 2007. "CAPS-1 and CAPS-2 Are Essential Synaptic Vesicle Priming Proteins." *Cell* 131 (4): 796–808. doi:10.1016/j.cell.2007.11.002.

Kabachinski, Greg, D. Michelle Kielar-Grevstad, Xingmin Zhang, Declan J. James, and Thomas F. J. Martin. 2016. "Resident CAPS on Dense-Core Vesicles Docks and Primes Vesicles for Fusion." *Molecular Biology of the Cell* 27 (4): 654–68. doi:10.1091/mbc.E15-07-0509.

Kabachinski, Greg, Masaki Yamaga, D. Michelle Kielar-Grevstad, Stephen Bruinsma, and Thomas F. J. Martin. 2014. "CAPS and Munc13 Utilize Distinct PIP2-Linked Mechanisms to Promote Vesicle Exocytosis." *Molecular Biology of the Cell* 25 (4): 508–21. doi:10.1091/mbc.E12-11-0829.

Kahn, Steven E., Mark E. Cooper, and Stefano Del Prato. 2014. "Pathophysiology and Treatment of Type 2 Diabetes: Perspectives on the Past, Present, and Future." *Lancet (London, England)* 383 (9922): 1068–83. doi:10.1016/S0140-6736(13)62154-6.

Kandel, Eric, James Schwartz, and Thomas Jessell. 2000. *Principles of Neural Science, Fourth Edition*. McGraw-Hill Companies, Incorporated.

Kasai, Haruo, Noriko Takahashi, and Hiroshi Tokumaru. 2012. "Distinct Initial SNARE Configurations Underlying the Diversity of Exocytosis." *Physiological Reviews* 92 (4): 1915–64. doi:10.1152/physrev.00007.2012.

Kendler, Kenneth S. 2013. "What Psychiatric Genetics Has Taught Us about the Nature of Psychiatric Illness and What Is Left to Learn." *Molecular Psychiatry* 18 (10): 1058–66. doi:10.1038/mp.2013.50.

Kieseppä, Tuula, Timo Partonen, Jari Haukka, Jaakko Kaprio, and Jouko Lönnqvist. 2004. "High Concordance of Bipolar I Disorder in a Nationwide Sample of Twins." *The American Journal of Psychiatry* 161 (10): 1814–21. doi:10.1176/ajp.161.10.1814.

Kovacsics, Colleen E., and Todd D. Gould. 2010. "Shock-Induced Aggression in Mice Is Modified by Lithium." *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 94 (3): 380–86. doi:10.1016/j.pbb.2009.09.020.

Kraepelin, Emile. 1913. "Traité de Psychiatrie 8ème éd, Ch. XI." In , 8ème edition. LaBar, K. S., J. C. Gatenby, J. C. Gore, J. E. LeDoux, and E. A. Phelps. 1998. "Human Amygdala Activation during Conditioned Fear Acquisition and Extinction: A Mixed-Trial fMRI Study." *Neuron* 20 (5): 937–45.

Laborit, H., P. Huguenard, and R. Alluaume. 1952. "[A new vegetative stabilizer; 4560 R.P..]" *La Presse Médicale* 60 (10): 206–8.

Lander, E., and L. Kruglyak. 1995. "Genetic Dissection of Complex Traits: Guidelines for Interpreting and Reporting Linkage Results." *Nature Genetics* 11 (3): 241–47. doi:10.1038/ng1195-241.

Lander, E. S., L. M. Linton, B. Birren, C. Nusbaum, M. C. Zody, J. Baldwin, K. Devon, et al. 2001. "Initial Sequencing and Analysis of the Human Genome." *Nature* 409 (6822): 860–921. doi:10.1038/35057062.

Leboyer, Marion, and David J. Kupfer. 2010. "Bipolar Disorder: New Perspectives in Health Care and Prevention." *The Journal of Clinical Psychiatry* 71 (12): 1689–95. doi:10.4088/JCP.10m06347yel.

Leboyer, Marion, José Oliveira, Ryad Tamouza, and Laurent Groc. 2016. "Is It Time for Immunopsychiatry in Psychotic Disorders?" *Psychopharmacology* 233 (9): 1651–60. doi:10.1007/s00213-016-4266-1.

Leboyer, M., F. Bellivier, P. McKeon, M. Albus, M. Borrman, F. Perez-Diaz, L. Mynett-Johnson, J. Feingold, and W. Maier. 1998. "Age at Onset and Gender Resemblance in Bipolar Siblings." *Psychiatry Research* 81 (2): 125–31.

Lee, Kok Wei, Puay San Woon, Yik Ying Teo, and Kang Sim. 2012. "Genome Wide Association Studies (GWAS) and Copy Number Variation (CNV) Studies of the Major Psychoses: What Have We Learnt?" *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 36 (1): 556–71. doi:10.1016/j.neubiorev.2011.09.001.

Lesch, K. P., D. Bengel, A. Heils, S. Z. Sabol, B. D. Greenberg, S. Petri, J. Benjamin, C. R. Müller, D. H. Hamer, and D. L. Murphy. 1996. "Association of Anxiety-Related Traits with a Polymorphism in the Serotonin Transporter Gene Regulatory Region." *Science (New York, N.Y.)* 274 (5292): 1527–31.

Lesch, K. P., and A. Schmitt. 2002. "Antidepressants and Gene Expression Profiling: How to SNARE Novel Drug Targets." *The Pharmacogenomics Journal* 2 (6): 346–48. doi:10.1038/sj.tpj.6500150.

Lichtenstein, Paul, Benjamin H. Yip, Camilla Björk, Yudi Pawitan, Tyrone D. Cannon, Patrick F. Sullivan, and Christina M. Hultman. 2009. "Common Genetic Determinants of Schizophrenia and Bipolar Disorder in Swedish Families: A Population-Based Study." *Lancet (London, England)* 373 (9659): 234–39. doi:10.1016/S0140-6736(09)60072-6.

Link, Egenhard, Lambert Edelmann, Judy H. Chou, Thomas Binz, Shinji Yamasaki, Uli Eisel, Marion Baumert, Thomas C. Südhof, Heiner Niemann, and Reinhard Jahn. 1992. "Tetanus Toxin Action: Inhibition of Neurotransmitter Release Linked to Synaptobrevin Proteolysis." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 189 (2): 1017–23. doi:10.1016/0006-291X(92)92305-H.

Lin, Ping-I., Melvin G. McInnis, James B. Potash, Virginia Willour, Dean F. MacKinnon, J. Raymond DePaulo, and Peter P. Zandi. 2006. "Clinical Correlates and Familial Aggregation of Age at Onset in Bipolar Disorder." *The American Journal of Psychiatry* 163 (2): 240–46. doi:10.1176/appi.ajp.163.2.240.

Liu, Lixiang, Tatiana Foroud, Xiaoling Xuei, Wade Berrettini, William Byerley, William Coryell, Rif El-Mallakh, et al. 2008. "Evidence of Association between Brain-Derived Neurotrophic Factor Gene and Bipolar Disorder." *Psychiatric Genetics* 18 (6): 267–74. doi:10.1097/YPG.0b013e3283060f59.

Locke, John. 1690. *An Essay Concerning Human Understanding, 1690*. Scholar Press.
Lorry, Anne-Charles. 1765. *De melancholia et morbis melancholicis. Tomus primus. (Tomus secundus tentamina ad horum curationem complectens.)*. apud P.G. Cavelier.

Maclean, P. D. 1955. "The Limbic System ('visceral Brain') and Emotional Behavior." *A.M.A. Archives of Neurology and Psychiatry* 73 (2): 130–34.

Ma, Cong, Wei Li, Yibin Xu, and Josep Rizo. 2011. "Munc13 Mediates the Transition from the Closed Syntaxin-Munc18 Complex to the SNARE Complex." *Nature Structural & Molecular Biology* 18 (5): 542–49. doi:10.1038/nsmb.2047.

Mamounas, L. A., C. A. Altar, M. E. Blue, D. R. Kaplan, L. Tessarollo, and W. E. Lyons. 2000. "BDNF Promotes the Regenerative Sprouting, but Not Survival, of Injured Serotonergic Axons in the Adult Rat Brain." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 20 (2): 771–82.

Marmigère, Frédéric, Laurent Givalois, Florence Rage, Sandor Arancibia, and Lucia Tapia-Arancibia. 2003. "Rapid Induction of BDNF Expression in the Hippocampus during Immobilization Stress Challenge in Adult Rats." *Hippocampus* 13 (5): 646–55. doi:10.1002/hipo.10109.

McEwen, Bruce S., Nicole P. Bowles, Jason D. Gray, Matthew N. Hill, Richard G. Hunter, Iliia N. Karatsoreos, and Carla Nasca. 2015. "Mechanisms of Stress in the Brain." *Nature Neuroscience* 18 (10): 1353–63. doi:10.1038/nn.4086.

McGuffin, Peter, Jo Knight, Gerome Breen, Shyama Brewster, Peter R. Boyd, Nick Craddock, Mike Gill, et al. 2005. "Whole Genome Linkage Scan of Recurrent Depressive Disorder from the Depression Network Study." *Human Molecular Genetics* 14 (22): 3337–45. doi:10.1093/hmg/ddi363.

McMahon, Francis J., Nirmala Akula, Thomas G. Schulze, Pierandrea Muglia, Federica Tozzi, Sevilla D. Detera-Wadleigh, C. J. M. Steele, et al. 2010. "Meta-Analysis of Genome-Wide Association Data Identifies a Risk Locus for Major Mood Disorders on 3p21.1." *Nature Genetics* 42 (2): 128–31. doi:10.1038/ng.523.

McQueen, Matthew B., B. Devlin, Stephen V. Faraone, Vishwajit L. Nimgaonkar, Pamela Sklar, Jordan W. Smoller, Rami Abou Jamra, et al. 2005. "Combined Analysis from Eleven Linkage Studies of Bipolar Disorder Provides Strong Evidence of Susceptibility Loci on Chromosomes 6q and 8q." *American Journal of Human Genetics* 77 (4): 582–95. doi:10.1086/491603.

Merikangas, Kathleen R., Hagop S. Akiskal, Jules Angst, Paul E. Greenberg, Robert M.A. Hirschfeld, Maria Petukhova, and Ronald C. Kessler. 2007. "Lifetime and 12-Month Prevalence of Bipolar Spectrum Disorder in the National Comorbidity Survey Replication." *Archives of General Psychiatry* 64 (5): 543–52. doi:10.1001/archpsyc.64.5.543.

Middlemiss, Derek N., Gary W. Price, and Jeannette M. Watson. 2002. "Serotonergic Targets in Depression." *Current Opinion in Pharmacology* 2 (1): 18–22.

Miller, K. G., A. Alfonso, M. Nguyen, J. A. Crowell, C. D. Johnson, and J. B. Rand. 1996. "A Genetic Selection for *Caenorhabditis Elegans* Synaptic Transmission Mutants." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (22): 12593–98.

Mirescu, Christian, and Elizabeth Gould. 2006. "Stress and Adult Neurogenesis." *Hippocampus* 16 (3): 233–38. doi:10.1002/hipo.20155.

Mishima, Yuriko, Yo Shinoda, Tetsushi Sadakata, Masami Kojima, Shigeharu Wakana, and Teiichi Furuichi. 2015. "Lack of Stress Responses to Long-Term Effects of Corticosterone in Caps2 Knockout Mice." *Scientific Reports* 5: 8932. doi:10.1038/srep08932.

- Missale, C., S. R. Nash, S. W. Robinson, M. Jaber, and M. G. Caron. 1998. "Dopamine Receptors: From Structure to Function." *Physiological Reviews* 78 (1): 189–225.
- Monteggia, Lisa M., Michel Barrot, Craig M. Powell, Olivier Berton, Victor Galanis, Terry Gemelli, Sven Meuth, Andreas Nagy, Robert W. Greene, and Eric J. Nestler. 2004. "Essential Role of Brain-Derived Neurotrophic Factor in Adult Hippocampal Function." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (29): 10827–32. doi:10.1073/pnas.0402141101.
- Müller, Daniel J., Clement C. Zai, Takahiro Shinkai, John Strauss, and James L. Kennedy. 2011. "Association between the DAOA/G72 Gene and Bipolar Disorder and Meta-Analyses in Bipolar Disorder and Schizophrenia." *Bipolar Disorders* 13 (2): 198–207. doi:10.1111/j.1399-5618.2011.00905.x.
- Neale, Benjamin M., Sarah E. Medland, Stephan Ripke, Philip Asherson, Barbara Franke, Klaus-Peter Lesch, Stephen V. Faraone, et al. 2010. "Meta-Analysis of Genome-Wide Association Studies of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder." *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry* 49 (9): 884–97. doi:10.1016/j.jaac.2010.06.008.
- Neisser, Ulric. 1991. "The Development of Self: The First Three Years Two Perceptually given Aspects of the Self and Their Development." *Developmental Review* 11 (3): 197–209. doi:10.1016/0273-2297(91)90009-D.
- Nguyen Truong, Cuc Quynh, Dennis Nestvogel, Olga Ratai, Claudia Schirra, David R. Stevens, Nils Brose, JeongSeop Rhee, and Jens Rettig. 2014. "Secretory Vesicle Priming by CAPS Is Independent of Its SNARE-Binding MUN Domain." *Cell Reports* 9 (3): 902–9. doi:10.1016/j.celrep.2014.09.050.
- Nibuya, M., S. Morinobu, and R. S. Duman. 1995. "Regulation of BDNF and trkB mRNA in Rat Brain by Chronic Electroconvulsive Seizure and Antidepressant Drug Treatments." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 15 (11): 7539–47.
- Nibuya, M., E. J. Nestler, and R. S. Duman. 1996. "Chronic Antidepressant Administration Increases the Expression of cAMP Response Element Binding Protein (CREB) in Rat Hippocampus." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 16 (7): 2365–72.
- Nicolas, Aude. 2011. "Recherche de gènes de vulnérabilité aux troubles bipolaire." Université Paris-Est.
- O'Brien, W. Timothy, Amber DeAra Harper, Fernando Jové, James R. Woodgett, Silvia Maretto, Stefano Piccolo, and Peter S. Klein. 2004. "Glycogen Synthase Kinase-3beta Haploinsufficiency Mimics the Behavioral and Molecular Effects of Lithium." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 24 (30): 6791–98. doi:10.1523/JNEUROSCI.4753-03.2004.

Oliveira, José, Rémi Kazma, Edith Le Floch, Meriem Bennabi, Nora Hamdani, Djaouida Bengoufa, Mehdi Dahoun, et al. 2016. "Toxoplasma Gondii Exposure May Modulate the Influence of TLR2 Genetic Variation on Bipolar Disorder: A Gene-Environment Interaction Study." *International Journal of Bipolar Disorders* 4 (1): 11. doi:10.1186/s40345-016-0052-6.

Osby, U., L. Brandt, N. Correia, A. Ekbom, and P. Sparén. 2001. "Excess Mortality in Bipolar and Unipolar Disorder in Sweden." *Archives of General Psychiatry* 58 (9): 844–50.

Ospina-Duque, J., C. Duque, L. Carvajal-Carmona, D. Ortiz-Barrientos, I. Soto, N. Pineda, M. Cuartas, et al. 2000. "An Association Study of Bipolar Mood Disorder (type I) with the 5-HTTLPR Serotonin Transporter Polymorphism in a Human Population Isolate from Colombia." *Neuroscience Letters* 292 (3): 199–202.

Palo, Outi M., Pia Soronen, Kaisa Silander, Teppo Varilo, Katja Tuononen, Tuula Kiesepä, Timo Partonen, Jouko Lönnqvist, Tiina Paunio, and Leena Peltonen. 2010. "Identification of Susceptibility Loci at 7q31 and 9p13 for Bipolar Disorder in an Isolated Population." *American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics: The Official Publication of the International Society of Psychiatric Genetics* 153B (3): 723–35. doi:10.1002/ajmg.b.31039.

Papez, J. W. 1995. "A Proposed Mechanism of Emotion. 1937." *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences* 7 (1): 103–12. doi:10.1176/jnp.7.1.103.

Paracelse. 1926. In *Paracelsus Sämtliche Werke. Nach Der ... Huserschen Gesamtausgabe ... Zum Erstenmal in Neuzeitliches Deutsch Übersetzt. Mit Einleitung, Biographie, Literaturangaben Und Erklärenden Anmerkungen Versehen Von Dr. Bernhard Aschner. [With a Portrait.]*, 2:391.

Parsaud, Leon, Lijun Li, Chang Hun Jung, Seungmee Park, Ner Mu Nar Saw, Sanghyun Park, Moo Yup Kim, and Shuzo Sugita. 2013. "Calcium-Dependent Activator Protein for Secretion 1 (CAPS1) Binds to Syntaxin-1 in a Distinct Mode from Munc13-1." *The Journal of Biological Chemistry* 288 (32): 23050–63. doi:10.1074/jbc.M113.494088.

Perron, H., N. Hamdani, R. Faucard, M. Lajnef, S. Jamain, C. Daban-Huard, S. Sarrazin, et al. 2012. "Molecular Characteristics of Human Endogenous Retrovirus Type-W in Schizophrenia and Bipolar Disorder." *Translational Psychiatry* 2: e201. doi:10.1038/tp.2012.125.

Pinel, Philippe. 1809. In *Traité médico-philosophique sur l'aliénation mentale*, 201–2. Brosson.

Plater, Felix. 1609. In *Praxeos Medicae Ires Tomi*. Bale.

Popper, Karl R. 1934. *La logique de la découverte scientifique*. Payot.

- Porsolt, R. D., M. Deniel, and M. Jalfre. 1979. "Forced Swimming in Rats: Hypothermia, Immobility and the Effects of Imipramine." *European Journal of Pharmacology* 57 (4): 431–36.
- Postel, Jacques. 1998. In *Genèse de la psychiatrie: les premiers écrits de Philippe Pinel*, 44–46. Institut Synthélabo.
- Psychiatric GWAS Consortium Steering Committee. 2009. "A Framework for Interpreting Genome-Wide Association Studies of Psychiatric Disorders." *Molecular Psychiatry* 14 (1): 10–17. doi:10.1038/mp.2008.126.
- Pyle, Jason L, Ege T Kavalali, Sukwoo Choi, and Richard W Tsien. 1999. "Visualization of Synaptic Activity in Hippocampal Slices with FM1-43 Enabled by Fluorescence Quenching." *Neuron* 24 (4): 803–8. doi:10.1016/S0896-6273(00)81028-4.
- Rakofsky, J. J., K. J. Ressler, and B. W. Dunlop. 2012. "BDNF Function as a Potential Mediator of Bipolar Disorder and Post-Traumatic Stress Disorder Comorbidity." *Molecular Psychiatry* 17 (1): 22–35. doi:10.1038/mp.2011.121.
- Ramakers, G. J., H. van Galen, M. G. Feenstra, M. A. Corner, and G. J. Boer. 1994. "Activity-Dependent Plasticity of Inhibitory and Excitatory Amino Acid Transmitter Systems in Cultured Rat Cerebral Cortex." *International Journal of Developmental Neuroscience: The Official Journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 12 (7): 611–21.
- Ramón y Cajal S. [1892]. 1977. "A New Concept of the Histology of the Central Nervous System. DA Rottenberg (transl)." In . New York: Hafner.
- Reddy, Madhavi K, Thomas D. Meyer, Natalie M. Wittlin, Ivan W. Miller, and Lauren M. Weinstock. 2016. "Bipolar I Disorder with Comorbid PTSD: Demographic and Clinical Correlates in a Sample of Hospitalized Patients." *Comprehensive Psychiatry* 72 (August): 13–17. doi:10.1016/j.comppsy.2016.08.007.
- Renden, R., B. Berwin, W. Davis, K. Ann, C. T. Chin, R. Kreber, B. Ganetzky, T. F. Martin, and K. Broadie. 2001. "Drosophila CAPS Is an Essential Gene That Regulates Dense-Core Vesicle Release and Synaptic Vesicle Fusion." *Neuron* 31 (3): 421–37.
- Rice, J., T. Reich, N. C. Andreasen, J. Endicott, M. Van Eerdewegh, R. Fishman, R. M. Hirschfeld, and G. L. Klerman. 1987. "The Familial Transmission of Bipolar Illness." *Archives of General Psychiatry* 44 (5): 441–47.
- Ripke, Stephan, Naomi R. Wray, Cathryn M. Lewis, Steven P. Hamilton, Myrna M. Weissman, Jerome Breen, Enda M. Byrne, et al. 2013. "A Mega-Analysis of Genome-Wide Association Studies for Major Depressive Disorder." *Molecular Psychiatry* 18 (4): 497–511. doi:10.1038/mp.2012.21.
- Rogers, G. B., D. J. Keating, R. L. Young, M.-L. Wong, J. Licinio, and S. Wesselingh. 2016. "From Gut Dysbiosis to Altered Brain Function and Mental Illness: Mechanisms and Pathways." *Molecular Psychiatry* 21 (6): 738–48. doi:10.1038/mp.2016.50.

Roghani, A., J. Feldman, S. A. Kohan, A. Shirzadi, C. B. Gundersen, N. Brecha, and R. H. Edwards. 1994. "Molecular Cloning of a Putative Vesicular Transporter for Acetylcholine." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (22): 10620–24.

Romans, S. E., and H. M. McPherson. 1992. "The Social Networks of Bipolar Affective Disorder Patients." *Journal of Affective Disorders* 25 (4): 221–28.

Roosendaal, B., R. G. Phillips, A. E. Power, S. M. Brooke, R. M. Sapolsky, and J. L. McGaugh. 2001. "Memory Retrieval Impairment Induced by Hippocampal CA3 Lesions Is Blocked by Adrenocortical Suppression." *Nature Neuroscience* 4 (12): 1169–71. doi:10.1038/nn766.

Roper, J. A., M. Craighead, A.-M. O'Carroll, and S. J. Lolait. 2010. "Attenuated Stress Response to Acute Restraint and Forced Swimming Stress in Arginine Vasopressin 1b Receptor Subtype (Avpr1b) Receptor Knockout Mice and Wild-Type Mice Treated with a Novel Avpr1b Receptor Antagonist." *Journal of Neuroendocrinology* 22 (11): 1173–80. doi:10.1111/j.1365-2826.2010.02070.x.

Rosenmund, Christian, Albrecht Sigler, Iris Augustin, Kerstin Reim, Nils Brose, and Jeong Seop Rhee. 2002. "Differential Control of Vesicle Priming and Short-Term Plasticity by Munc13 Isoforms." *Neuron* 33 (3): 411–24.

Rutherford, L. C., S. B. Nelson, and G. G. Turrigiano. 1998. "BDNF Has Opposite Effects on the Quantal Amplitude of Pyramidal Neuron and Interneuron Excitatory Synapses." *Neuron* 21 (3): 521–30.

Sachar, E. J. 1977. "ACTH and Cortisol Secretion in Psychiatric Disease." *Annals of the New York Academy of Sciences* 297 (October): 621–27.

Sachidanandam, R., D. Weissman, S. C. Schmidt, J. M. Kakol, L. D. Stein, G. Marth, S. Sherry, et al. 2001. "A Map of Human Genome Sequence Variation Containing 1.42 Million Single Nucleotide Polymorphisms." *Nature* 409 (6822): 928–33. doi:10.1038/35057149.

Sadakata, Tetsushi, and Teiichi Furuichi. 2009. "Developmentally Regulated Ca²⁺-Dependent Activator Protein for Secretion 2 (CAPS2) Is Involved in BDNF Secretion and Is Associated with Autism Susceptibility." *Cerebellum (London, England)* 8 (3): 312–22. doi:10.1007/s12311-009-0097-5.

Sadakata, Tetsushi, Makoto Itakura, Shunji Kozaki, Yukiko Sekine, Masami Takahashi, and Teiichi Furuichi. 2006. "Differential Distributions of the Ca²⁺-Dependent Activator Protein for Secretion Family Proteins (CAPS2 and CAPS1) in the Mouse Brain." *The Journal of Comparative Neurology* 495 (6): 735–53. doi:10.1002/cne.20947.

Sadakata, Tetsushi, Akira Mizoguchi, Yumi Sato, Ritsuko Katoh-Semba, Mitsunori Fukuda, Katsuhiko Mikoshiba, and Teiichi Furuichi. 2004. "The Secretory Granule-Associated Protein CAPS2 Regulates Neurotrophin Release and Cell Survival." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 24 (1): 43–52. doi:10.1523/JNEUROSCI.2528-03.2004.

Sadakata, Tetsushi, Yo Shinoda, Megumi Oka, Yukiko Sekine, Yumi Sato, Chihiro Saruta, Hideki Miwa, Mika Tanaka, Shigeyoshi Itoharu, and Teiichi Furuichi. 2012. "Reduced Axonal Localization of a Caps2 Splice Variant Impairs Axonal Release of BDNF and Causes Autistic-like Behavior in Mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (51): 21104–9. doi:10.1073/pnas.1210055109.

Sadakata, Tetsushi, Miwa Washida, Yoshimi Iwayama, Satoshi Shoji, Yumi Sato, Takeshi Ohkura, Ritsuko Katoh-Semba, et al. 2007. "Autistic-like Phenotypes in Cadps2-Knockout Mice and Aberrant CADPS2 Splicing in Autistic Patients." *The Journal of Clinical Investigation* 117 (4): 931–43. doi:10.1172/JCI29031.

Saito, Hiroto, Mitsuhiro Kato, Takeshi Mizuguchi, Keisuke Hamada, Hitoshi Osaka, Jun Tohyama, Katsuhisa Urano, et al. 2008. "De Novo Mutations in the Gene Encoding STXBP1 (MUNC18-1) Cause Early Infantile Epileptic Encephalopathy." *Nature Genetics* 40 (6): 782–88. doi:10.1038/ng.150.

Sandoval, Gisela M., Janet S. Duerr, Jonathan Hodgkin, James B. Rand, and Gary Ruvkun. 2006. "A Genetic Interaction between the Vesicular Acetylcholine Transporter VACHT/UNC-17 and synaptobrevin/SNB-1 in *C. Elegans*." *Nature Neuroscience* 9 (5): 599–601. doi:10.1038/nn1685.

Sauvages, François Boissier de. 1772. In *Nosologie methodique*, 159. chez Jean-Marie Bruyset.

Schachter. 1964. "The Interaction of Cognitive and Physiological Determinants of Emotional State." *Advances in Experimental Social Psychology* 1: 49–80.

Schulman, H., and P. Greengard. 1978. "Stimulation of Brain Membrane Protein Phosphorylation by Calcium and an Endogenous Heat-Stable Protein." *Nature* 271 (5644): 478–79.

Schulze, Thomas G., and Francis J. McMahon. 2003. "Genetic Linkage and Association Studies in Bipolar Affective Disorder: A Time for Optimism." *American Journal of Medical Genetics. Part C, Seminars in Medical Genetics* 123C (1): 36–47. doi:10.1002/ajmg.c.20012.

Scott, Laura J., Pierandrea Muglia, Xiangyang Q. Kong, Weihua Guan, Matthew Flickinger, Ruchi Upmanyu, Federica Tozzi, et al. 2009. "Genome-Wide Association and Meta-Analysis of Bipolar Disorder in Individuals of European Ancestry." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (18): 7501–6. doi:10.1073/pnas.0813386106.

Segurado, Ricardo, Sevilla D. Detera-Wadleigh, Douglas F. Levinson, Cathryn M. Lewis, Michael Gill, John I. Nurnberger Jr., Nick Craddock, et al. 2003. "Genome Scan Meta-Analysis of Schizophrenia and Bipolar Disorder, Part III: Bipolar Disorder." *The American Journal of Human Genetics* 73 (1): 49–62. doi:10.1086/376547.

Serretti, A., and L. Mandelli. 2008. "The Genetics of Bipolar Disorder: Genome 'Hot Regions,' Genes, New Potential Candidates and Future Directions." *Molecular Psychiatry* 13 (8): 742–71. doi:10.1038/mp.2008.29.

Shafer, T. J., and W. D. Atchison. 1991. "Transmitter, Ion Channel and Receptor Properties of Pheochromocytoma (PC12) Cells: A Model for Neurotoxicological Studies." *Neurotoxicology* 12 (3): 473–92.

Sherrington, Charles Scott. 1920. *The Integrative Action of the Nervous System*. New Haven Yale University Press. <http://archive.org/details/integrativeactio00sherooft>.

Shippee, Nathan D., Nilay D. Shah, Mark D. Williams, James P. Moriarty, Mark A. Frye, and Jeanette Y. Ziegenfuss. 2011. "Differences in Demographic Composition and in Work, Social, and Functional Limitations among the Populations with Unipolar Depression and Bipolar Disorder: Results from a Nationally Representative Sample." *Health and Quality of Life Outcomes* 9: 90. doi:10.1186/1477-7525-9-90.

Shorter, James, Matthew B. Beard, Joachim Seemann, A. Barbara Dirac-Svejstrup, and Graham Warren. 2002. "Sequential Tethering of Golgins and Catalysis of SNAREpin Assembly by the Vesicle-Tethering Protein p115." *The Journal of Cell Biology* 157 (1): 45–62. doi:10.1083/jcb.200112127.

Smith, E. N., C. S. Bloss, J. A. Badner, T. Barrett, P. L. Belmonte, W. Berrettini, W. Byerley, et al. 2009. "Genome-Wide Association Study of Bipolar Disorder in European American and African American Individuals." *Molecular Psychiatry* 14 (8): 755–63. doi:10.1038/mp.2009.43.

Smith, Erin N., Daniel L. Koller, Corrie Panganiban, Szabolcs Szelinger, Peng Zhang, Judith A. Badner, Thomas B. Barrett, et al. 2011. "Genome-Wide Association of Bipolar Disorder Suggests an Enrichment of Replicable Associations in Regions near Genes." *PLoS Genet* 7 (6): e1002134. doi:10.1371/journal.pgen.1002134.

Smith, M. A., S. Makino, S. Y. Kim, and R. Kvetnansky. 1995. "Stress Increases Brain-Derived Neurotropic Factor Messenger Ribonucleic Acid in the Hypothalamus and Pituitary." *Endocrinology* 136 (9): 3743–50. doi:10.1210/endo.136.9.7649080.

Smoller, Jordan W., and Christine T. Finn. 2003. "Family, Twin, and Adoption Studies of Bipolar Disorder." *American Journal of Medical Genetics. Part C, Seminars in Medical Genetics* 123C (1): 48–58. doi:10.1002/ajmg.c.20013.

Söllner, Thomas, Mark K. Bennett, Sidney W. Whiteheart, Richard H. Scheller, and James E. Rothman. 1993. "A Protein Assembly-Disassembly Pathway in Vitro That May Correspond to Sequential Steps of Synaptic Vesicle Docking, Activation, and Fusion." *Cell* 75 (3): 409–18. doi:10.1016/0092-8674(93)90376-2.

Sommer, J. U., A. Schmitt, M. Heck, E. L. Schaeffer, M. Fendt, M. Zink, K. Nieselt, et al. 2010. "Differential Expression of Presynaptic Genes in a Rat Model of Postnatal Hypoxia: Relevance to Schizophrenia." *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience* 260 Suppl 2 (November): S81–89. doi:10.1007/s00406-010-0159-1.

Sousa, N. 2016. "The Dynamics of the Stress Neuromatrix." *Molecular Psychiatry* 21 (3): 302–12. doi:10.1038/mp.2015.196.

Speidel, Dina, Cathrin E. Bruederle, Carsten Enk, Thomas Voets, Frederique Varoqueaux, Kerstin Reim, Ute Becherer, et al. 2005. "CAPS1 Regulates Catecholamine Loading of Large Dense-Core Vesicles." *Neuron* 46 (1): 75–88. doi:10.1016/j.neuron.2005.02.019.

Speidel, Dina, Albert Salehi, Stefanie Obermueller, Ingmar Lundquist, Nils Brose, Erik Renström, and Patrik Rorsman. 2008. "CAPS1 and CAPS2 Regulate Stability and Recruitment of Insulin Granules in Mouse Pancreatic Beta Cells." *Cell Metabolism* 7 (1): 57–67. doi:10.1016/j.cmet.2007.11.009.

Speidel, Dina, Frederique Varoqueaux, Carsten Enk, Mari Nojiri, Ruslan N. Grishanin, Thomas F. J. Martin, Kay Hofmann, Nils Brose, and Kerstin Reim. 2003. "A Family of Ca²⁺-Dependent Activator Proteins for Secretion: Comparative Analysis of Structure, Expression, Localization, and Function." *The Journal of Biological Chemistry* 278 (52): 52802–9. doi:10.1074/jbc.M304727200.

Stevens, Charles F., and James H. Williams. 2000. "'Kiss and Run' Exocytosis at Hippocampal Synapses." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (23): 12828–33. doi:10.1073/pnas.230438697.

Strober, M., M. DeAntonio, S. Schmidt-Lackner, R. Freeman, C. Lampert, and J. Diamond. 1998. "Early Childhood Attention Deficit Hyperactivity Disorder Predicts Poorer Response to Acute Lithium Therapy in Adolescent Mania." *Journal of Affective Disorders* 51 (2): 145–51.

Südhof, Thomas C. 2004. "The Synaptic Vesicle Cycle." *Annual Review of Neuroscience* 27 (1): 509–47. doi:10.1146/annurev.neuro.26.041002.131412.

———. 2005. "CAPS in Search of a Lost Function." *Neuron* 46 (1): 2–4. doi:10.1016/j.neuron.2005.03.017.

———. 2008. "Neuroligins and Neurexins Link Synaptic Function to Cognitive Disease." *Nature* 455 (7215): 903–11. doi:10.1038/nature07456.

Südhof, Thomas C. 2013. "Neurotransmitter Release: The Last Millisecond in the Life of a Synaptic Vesicle." *Neuron* 80 (3): 675–90. doi:10.1016/j.neuron.2013.10.022.

Suppes, T., G. S. Leverich, P. E. Keck, W. A. Nolen, K. D. Denicoff, L. L. Altshuler, S. L. McElroy, et al. 2001. "The Stanley Foundation Bipolar Treatment Outcome Network. II. Demographics and Illness Characteristics of the First 261 Patients." *Journal of Affective Disorders* 67 (1-3): 45–59.

Szapacs, Matthew E., Tiffany A. Mathews, Lino Tessarollo, W. Ernest Lyons, Laura A. Mamounas, and Anne M. Andrews. 2004. "Exploring the Relationship between Serotonin and Brain-Derived Neurotrophic Factor: Analysis of BDNF Protein and Extraneuronal 5-HT in Mice with Reduced Serotonin Transporter or BDNF Expression." *Journal of Neuroscience Methods* 140 (1-2): 81–92. doi:10.1016/j.jneumeth.2004.03.026.

- Takei, Shiro, Shigeru Morinobu, Shigeto Yamamoto, Manabu Fuchikami, Tomoya Matsumoto, and Shigeto Yamawaki. 2011. "Enhanced Hippocampal BDNF/TrkB Signaling in Response to Fear Conditioning in an Animal Model of Posttraumatic Stress Disorder." *Journal of Psychiatric Research* 45 (4): 460–68. doi:10.1016/j.jpsychires.2010.08.009.
- Tandon, A., S. Bannykh, J. A. Kowalchuk, A. Banerjee, T. F. Martin, and W. E. Balch. 1998. "Differential Regulation of Exocytosis by Calcium and CAPS in Semi-Intact Synaptosomes." *Neuron* 21 (1): 147–54.
- Turrigiano, Gina G. 2008. "The Self-Tuning Neuron: Synaptic Scaling of Excitatory Synapses." *Cell* 135 (3): 422–35. doi:10.1016/j.cell.2008.10.008.
- Ueyama, T., Y. Kawai, K. Nemoto, M. Sekimoto, S. Toné, and E. Senba. 1997. "Immobilization Stress Reduced the Expression of Neurotrophins and Their Receptors in the Rat Brain." *Neuroscience Research* 28 (2): 103–10.
- Uher, R. 2009. "The Role of Genetic Variation in the Causation of Mental Illness: An Evolution-Informed Framework." *Molecular Psychiatry* 14 (12): 1072–82. doi:10.1038/mp.2009.85.
- Vancampfort, Davy, Alex J. Mitchell, Marc De Hert, Pascal Sienaert, Michel Probst, Roselien Buys, and Brendon Stubbs. 2015. "Prevalence and Predictors of Type 2 Diabetes Mellitus in People with Bipolar Disorder: A Systematic Review and Meta-Analysis." *The Journal of Clinical Psychiatry* 76 (11): 1490–99. doi:10.4088/JCP.14r09635.
- Varoqueaux, Frederique, Albrecht Sigler, Jeong-Seop Rhee, Nils Brose, Carsten Enk, Kerstin Reim, and Christian Rosenmund. 2002. "Total Arrest of Spontaneous and Evoked Synaptic Transmission but Normal Synaptogenesis in the Absence of Munc13-Mediated Vesicle Priming." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (13): 9037–42. doi:10.1073/pnas.122623799.
- Voineagu, Irina, Xinchun Wang, Patrick Johnston, Jennifer K. Lowe, Yuan Tian, Steve Horvath, Jonathan Mill, Rita M. Cantor, Benjamin J. Blencowe, and Daniel H. Geschwind. 2011. "Transcriptomic Analysis of Autistic Brain Reveals Convergent Molecular Pathology." *Nature* 474 (7351): 380–84. doi:10.1038/nature10110.
- Voltaire. 1819. *Œuvres complètes de Voltaire: Dictionnaire philosophique*. Antoine-Augustin Renouard.
- Vrljic, Marija, Pavel Strop, James A. Ernst, R. Bryan Sutton, Steven Chu, and Axel T. Brunger. 2010. "Molecular Mechanism of the Synaptotagmin-SNARE Interaction in Ca²⁺-Triggered Vesicle Fusion." *Nature Structural & Molecular Biology* 17 (3): 325–31. doi:10.1038/nsmb.1764.
- Walent, J. H., B. W. Porter, and T. F. Martin. 1992. "A Novel 145 Kd Brain Cytosolic Protein Reconstitutes Ca(2+)-Regulated Secretion in Permeable Neuroendocrine Cells." *Cell* 70 (5): 765–75.

- Weber, T., B. V. Zemelman, J. A. McNew, B. Westermann, M. Gmachl, F. Parlati, T. H. Söllner, and J. E. Rothman. 1998. "SNAREpins: Minimal Machinery for Membrane Fusion." *Cell* 92 (6): 759–72.
- Weimer, Robby M., Elena O. Gracheva, Olivier Meyrignac, Kenneth G. Miller, Janet E. Richmond, and Jean-Louis Bessereau. 2006. "UNC-13 and UNC-10/rim Localize Synaptic Vesicles to Specific Membrane Domains." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 26 (31): 8040–47. doi:10.1523/JNEUROSCI.2350-06.2006.
- Weiskrantz, L. 1956. "Behavioral Changes Associated with Ablation of the Amygdaloid Complex in Monkeys." *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 49 (4): 381–91.
- Wellcome Trust Case Control Consortium. 2007. "Genome-Wide Association Study of 14,000 Cases of Seven Common Diseases and 3,000 Shared Controls." *Nature* 447 (7145): 661–78. doi:10.1038/nature05911.
- Whiteford, Harvey A., Louisa Degenhardt, Jürgen Rehm, Amanda J. Baxter, Alize J. Ferrari, Holly E. Erskine, Fiona J. Charlson, et al. 2013. "Global Burden of Disease Attributable to Mental and Substance Use Disorders: Findings from the Global Burden of Disease Study 2010." *Lancet (London, England)* 382 (9904): 1575–86. doi:10.1016/S0140-6736(13)61611-6.
- Wightman, R. Mark, and Christy L. Haynes. 2004. "Synaptic Vesicles Really Do Kiss and Run." *Nature Neuroscience* 7 (4): 321–22. doi:10.1038/nn0404-321.
- Willis, Thomas. 1695. In *Opera Omnia*, 2:255. De Tournes.
- Wilson, Duncan W., Celeste A. Wilcox, Gregory C. Flynn, Ellson Chen, Wun-Jing Kuang, William J. Henzel, Marc R. Block, Axel Ullrich, and James E. Rothman. 1989. "A Fusion Protein Required for Vesicle-Mediated Transport in Both Mammalian Cells and Yeast." *Nature* 339 (6223): 355–59. doi:10.1038/339355a0.
- Winham, S. J., A. B. Cuellar-Barboza, A. Oliveros, S. L. McElroy, S. Crow, C. Colby, D.-S. Choi, M. Chauhan, M. Frye, and J. M. Biernacka. 2014. "Genome-Wide Association Study of Bipolar Disorder Accounting for Effect of Body Mass Index Identifies a New Risk Allele in TCF7L2." *Molecular Psychiatry* 19 (9): 1010–16. doi:10.1038/mp.2013.159.
- Wojcik, Sonja M., and Nils Brose. 2007. "Regulation of Membrane Fusion in Synaptic Excitation-Secretion Coupling: Speed and Accuracy Matter." *Neuron* 55 (1): 11–24. doi:10.1016/j.neuron.2007.06.013.
- Wu, M. N., K. L. Schulze, T. E. Lloyd, and H. J. Bellen. 2001. "The ROP-Syntaxin Interaction Inhibits Neurotransmitter Release." *European Journal of Cell Biology* 80 (2): 196–99. doi:10.1078/0171-9335-00143.

Yamada, M., K. Takahashi, M. Tsunoda, G. Nishioka, K. Kudo, H. Ohata, K. Kamijima, T. Higuchi, K. Momose, and M. Yamada. 2002. "Differential Expression of VAMP2/synaptobrevin-2 after Antidepressant and Electroconvulsive Treatment in Rat Frontal Cortex." *The Pharmacogenomics Journal* 2 (6): 377–82. doi:10.1038/sj.tpj.6500135.

Zepf, Florian D. 2009. "Attention Deficit-Hyperactivity Disorder and Early-Onset Bipolar Disorder: Two Facets of One Entity?" *Dialogues in Clinical Neuroscience* 11 (1): 63–72.

Zhang, Qi, Yulong Li, and Richard W. Tsien. 2009. "The Dynamic Control of Kiss-and-Run and Vesicular Reuse Probed with Single Nanoparticles." *Science (New York, N.Y.)* 323 (5920): 1448–53. doi:10.1126/science.1167373.

ANNEXES

Annexe I - Critères diagnostiques du Mini DSM-V

Troubles bipolaires et apparentés

Trouble bipolaire de type I

Pour un diagnostic de trouble bipolaire de type 1, les critères suivants d'un épisode maniaque doivent être réunis. L'épisode maniaque peut précéder ou succéder à des épisodes hypomaniaques ou dépressifs caractérisés.

Épisode maniaque

A. Une période nettement délimitée durant laquelle l'humeur est élevée, expansive ou irritable de façon anormale et persistante, avec une augmentation anormale et persistante de l'activité orientée vers un but ou de l'énergie, persistant la plupart du temps, presque tous les jours, pendant au moins une semaine (ou toute autre durée si une hospitalisation est nécessaire).

B. Au cours de cette période de perturbation de l'humeur et d'augmentation de l'énergie ou de l'activité, au moins 3 des symptômes suivants (4 si l'humeur est seulement irritable) sont présents avec une intensité significative et représentent un changement notable par rapport au comportement habituel :

1. Augmentation de l'estime de soi ou idées de grandeur.
2. Réduction du besoin de sommeil (p. ex. le sujet se sent reposé après seulement 3 heures de sommeil);
3. Plus grande communicabilité que d'habitude ou désir constant de parler.
4. Fuite des idées ou sensations subjectives que les pensées défilent.
5. Distractibilité (c.-à-d. que l'attention est trop facilement attirée par des stimuli extérieurs sans importance ou non pertinents) rapportée ou observée.
6. Augmentation de l'activité orientée vers un but (social, professionnel, scolaire ou sexuel) ou agitation psychomotrice (c.-à-d. activité sans objectif, non orientée vers un but).
7. Engagement excessif dans des activités à potentiel élevé de conséquences dommageables (p. ex. la personne se lance sans retenue dans des achats inconsidérés, des conduites sexuelles inconséquentes ou des investissements commerciaux déraisonnables).

C. La perturbation de l'humeur est suffisamment grave pour entraîner une altération marquée du fonctionnement professionnel ou des activités sociales, ou pour nécessiter une hospitalisation afin de prévenir des conséquences dommageables pour le sujet ou pour autrui, ou bien il existe des caractéristiques psychotiques.

D. L'épisode n'est pas imputable aux effets physiologiques d'une substance (p. ex. substance donnant lieu à abus, médicament ou autre traitement) ou à une autre affection médicale.

N.B. : Un épisode maniaque complet qui apparaît au cours d'un traitement antidépresseur (p. ex. médicament, psychothérapie) mais qui persiste et remplit les critères complets d'un épisode au-delà du simple effet physiologique de ce traitement doit être considéré comme un épisode maniaque et conduire, par conséquent, à un diagnostic de trouble bipolaire 1.

N.B. : Les critères A à D définissent un épisode maniaque. Au moins un épisode maniaque au cours de la vie est nécessaire pour un diagnostic de trouble bipolaire

Épisode hypomaniaque

A. Une période nettement délimitée durant laquelle l'humeur est élevée, expansive ou irritable de façon anormale et persistante, avec une augmentation anormale et persistante de l'activité ou du niveau d'énergie, persistant la plupart du temps, presque tous les jours, pendant au moins 4 jours consécutifs.

B. Au cours de cette période de perturbation de l'humeur et d'augmentation de l'énergie ou de l'activité, au moins 3 des symptômes suivants (4 si l'humeur est seulement irritable) sont présents avec une intensité significative et représentent un changement notable par rapport au comportement habituel :

1. Augmentation de l'estime de soi ou idées de grandeur.
2. Réduction du besoin de sommeil (p. ex. le sujet se sent reposé après seulement 3 heures de sommeil).
3. Plus grande communicabilité que d'habitude ou désir constant de parler.
4. Fuite des idées ou sensations subjectives que les pensées défilent.
5. Distractibilité (p. ex. l'attention est trop facilement attirée par des stimuli extérieurs sans importance ou non pertinents) rapportée ou observée.
6. Augmentation de l'activité orientée vers un but (social, professionnel, scolaire ou sexuel) ou agitation psychomotrice.
7. Engagement excessif dans des activités à potentiel élevé de conséquences dommageables (p. ex. la personne se lance sans retenue dans des achats inconsidérés, des conduites sexuelles inconséquentes ou des investissements commerciaux déraisonnables).

C. L'épisode s'accompagne de modifications indiscutables du fonctionnement, qui diffère de celui du sujet hors période symptomatique.

D. La perturbation de l'humeur et la modification du fonctionnement sont manifestes pour les autres.

E. La sévérité de l'épisode n'est pas suffisante pour entraîner une altération marquée du fonctionnement professionnel ou social, ou pour nécessiter une hospitalisation. S'il existe des caractéristiques psychotiques, l'épisode est, par définition, maniaque.

F. L'épisode n'est pas imputable aux effets physiologiques d'une substance (p. ex. substance donnant lieu à abus, médicament ou autre traitement).

N.B. : Un épisode hypomaniaque complet qui apparaît au cours d'un traitement antidépresseur (p. ex. médicament, psychothérapie) mais qui persiste et remplit les critères complets d'un épisode au-delà du simple effet physiologique de ce traitement doit être diagnostiqué comme un épisode hypomaniaque. Toutefois, la prudence s'impose car un ou deux symptômes (en particulier une augmentation de l'irritabilité, de la nervosité ou de l'agitation après la prise d'un antidépresseur) ne sont pas suffisants pour un diagnostic d'épisode hypomaniaque, et ne sont pas obligatoirement indicatifs d'une diathèse bipolaire.

N.B. : Les critères A à F définissent un épisode hypomaniaque. Les épisodes hypomaniaques sont fréquents dans le trouble bipolaire 1 mais ne sont pas nécessaires pour poser ce diagnostic.

Épisode dépressif caractérisé

A. Au moins cinq des symptômes suivants sont présents pendant une même période d'une durée de 2 semaines et représentent un changement par rapport au fonctionnement antérieur ; au moins un des symptômes est soit (1) une humeur dépressive, soit (2) une perte d'intérêt ou de plaisir.

N.B. : Ne pas inclure des symptômes qui sont manifestement imputables à une autre affection médicale.

1. Humeur dépressive présente quasiment toute la journée, presque tous les jours, signalée par la personne (p. ex. se sent triste vide ou sans espoir) ou observée par les autres (p. ex. pleure).

(N.B. : Éventuellement irritabilité chez l'enfant et l'adolescent.)

2. Diminution marquée de l'intérêt ou du plaisir pour toutes ou presque toutes les activités quasiment toute la journée, presque tous les jours (signalée par la personne ou observée par les autres).

3. Perte ou gain de poids significatif en l'absence de régime (p. ex. modification du poids corporel excédant 5 % en un mois), ou diminution ou augmentation de l'appétit presque tous les jours.

(N.B. : Chez l'enfant, prendre en compte l'absence de prise de poids attendue.)

4. Insomnie ou hypersomnie presque tous les jours.

5. Agitation ou ralentissement psychomoteur presque tous les jours (constaté par les autres, non limité à un sentiment subjectif de fébrilité ou de ralentissement intérieur).

6. Fatigue ou perte d'énergie presque tous les jours

7. Sentiment de dévalorisation ou de culpabilité excessive ou inappropriée (qui peut être délirante) presque tous les jours (pas seulement se reprocher ou se sentir coupable d'être malade).

8. Diminution de l'aptitude à penser ou à se concentrer ou indécision presque tous les jours (signalée par le sujet ou observée par les autres).

9. Pensées de mort récurrentes (pas seulement une peur de mourir), idées suicidaires récurrentes sans plan précis, tentative de suicide ou plan précis pour se suicider.

B. Les symptômes induisent une détresse cliniquement significative ou une altération du fonctionnement social, professionnel ou dans d'autres domaines importants.

C. L'épisode n'est pas imputable aux effets physiologiques d'une substance ou d'une autre affection médicale

N.B. : Les critères A à C définissent un épisode dépressif caractérisé. Les épisodes dépressifs caractérisés sont fréquents au cours du trouble bipolaire 1 mais leur présence n'est pas requise pour son diagnostic.

N.B. : Les réponses à une perte significative (p. ex. deuil, ruine, pertes au cours d'une catastrophe naturelle, maladie grave ou handicap) peuvent comprendre des sentiments de tristesse intense, des ruminations à propos de la perte, une insomnie, un manque d'appétit et une perte de poids, symptômes inclus dans le critère A et évoquant un épisode dépressif. Bien que ces symptômes puissent être compréhensibles ou jugés appropriés compte tenu de la perte, la présence d'un épisode dépressif caractérisé, en plus de la réponse normale à une perte importante, doit être considérée attentivement. Cette décision fait appel au jugement clinique qui tiendra compte des antécédents de la personne et des normes culturelles de l'expression de la souffrance dans un contexte de perte¹.

Trouble bipolaire de type 1

A. A répondu aux critères d'au moins un épisode maniaque (critères A-D d'un « Épisode maniaque », *cf. supra*).

B. La survenue de l'épisode ou des épisodes maniaques ou dépressifs n'est pas mieux expliquée par un trouble schizotypique, une schizophrénie, un trouble schizophréniforme, un trouble délirant ou un autre trouble du spectre de la schizophrénie ou un autre trouble psychotique spécifié ou non spécifié.

Procédure de codage et d'enregistrement

Le code diagnostique du trouble bipolaire 1 repose sur le type de l'épisode actuel ou le plus récent et sa sévérité actuelle, la présence de symptômes psychotiques, et le fait qu'il est ou n'est pas en rémission. La sévérité et les caractéristiques psychotiques sont signalées seulement si les critères sont actuellement entièrement remplis pour un épisode maniaque ou dépressif caractérisé. Les spécifications relatives à la rémission sont signalées seulement si les critères ne sont actuellement pas entièrement remplis pour un épisode maniaque, hypomaniaque, ou dépressif caractérisé. Les codes sont les suivants :

Trouble bipolaire I	Épisode maniaque actuel ou le plus récent	Épisode hypomaniaque* actuel ou le plus récent	Épisode dépressif actuel ou le plus récent	Épisode non spécifié** actuel ou le plus récent
Léger (p. 83)	296.41 (F31.11)	NA	296.51 (F31.31)	NA
Moyen (p. 83)	296.42 (F31.12)	NA	296.52 (F31.32)	NA
Grave (p. 83)	296.43 (F31.13)	NA	296.53 (F31.4)	NA
Avec caractéristiques psychotiques*** (p. 80)	296.44 (F31.2)	NA	296.54 (F31.5)	NA
En rémission partielle (p. 83)	296.45 (F31.73)	296.45 (F31.71)	296.55 (F31.75)	NA
En rémission complète (p. 83)	296.46 (F31.74)	296.46 (F31.72)	296.56 (F31.76)	NA
Non spécifié	296.40 (F31.9)	296.40 (F31.9)	296.50 (F31.9)	NA

* Les spécifications pour sévérité et psychotique ne s'appliquent pas : coder 296 40 (F31 .0) les cas non en rémission.

** Les spécifications pour sévérité, psychotique et en rémission ne s'appliquent pas : Coder 296. 7 (F31 .9).

*** En cas de présence de caractéristiques psychotiques, coder la spécification avec

caractéristiques psychotiques " indépendamment de la sévérité de l'épisode.

Lorsqu'on enregistre le nom d'un diagnostic, les termes doivent être listés dans l'ordre suivant : trouble bipolaire 1, type de l'épisode actuel ou le plus récent, spécifications concernant sévérité/psychotique/en remission, puis toutes les spécifications non codées qui s'appliquent à l'épisode actuel ou le plus récent.

Spécifier :

Avec détresse anxieuse (p. 75)

Avec caractéristiques mixtes (p. 76)

Avec cycles rapides (p. 77)

Avec caractéristiques mélancoliques (p. 78)

Avec caractéristiques atypiques (p. 79)

Avec caractéristiques psychotiques congruentes à l'humeur (p. 80)

Avec catatonie (p. 80). **Note de codage : Utiliser le code additionnel 293.89 (F06.1).**

Avec début lors du péripartum (p. 80)

Avec caractère saisonnier (p. 81)

¹ Pour distinguer deuil et épisode dépressif caractérisé (EDC), il peut être utile de considérer que dans le deuil les sentiments prédominants sont le vide et la perte, alors que dans un EDC c'est plutôt une humeur dépressive persistante et une incapacité à anticiper la joie ou le plaisir. La dysphorie dans le deuil est susceptible de diminuer d'intensité au fil des jours et des semaines et survient par vagues que l'on qualifie d'affres de la douleur. Ces vagues ont tendance à être associées à des pensées ou des souvenirs de la personne décédée. L'humeur dépressive d'un EDC est plus persistante et n'est pas liée à des pensées ou des préoccupations spécifiques. La douleur du deuil peut être accompagnée par des émotions positives et par de l'humour, ce qui est différent de la tristesse et de la souffrance foncières caractéristiques de l'EDC. Le contenu des pensées associées au deuil est généralement caractérisé par des préoccupations et des souvenirs concernant la personne décédée plutôt que par les ruminations autocritiques ou pessimistes observées dans un EDC. Dans le deuil, l'estime de soi est généralement préservée, tandis que dans les EDC les sentiments de dévalorisation et de dégoût de soi sont communs. Si les idées autocritiques sont présentes dans le deuil, elles impliquent typiquement des sentiments de manquements vis-à-vis du défunt (p. ex. des visites trop rares, ne pas avoir dit assez au défunt combien on l'aimait). Si une personne endeuillée pense à la fin de vie et la mort, ses pensées se concentrent généralement sur le défunt et, éventuellement, sur le fait de le rejoindre, tandis que dans un EDC de telles pensées sont centrées sur le fait de mettre fin à sa propre vie à cause de sentiments de dévalorisation, d'indignité ou d'incapacité de faire face à la douleur de la dépression.

Trouble bipolaire de type II

296.89 (F31.81)

Pour un diagnostic de trouble bipolaire II, il est nécessaire de remplir les critères suivants d'un épisode hypomaniaque actuel ou passé et les critères suivants d'un épisode dépressif caractérisé actuel ou passé:

Épisode hypomaniaque

- A. Une période nettement délimitée durant laquelle l'humeur est élevée, expansive ou irritable de façon anormale et persistante, avec une augmentation anormale et persistante de l'activité ou du niveau d'énergie, persistant la plupart du temps, presque tout les jours, pendant au moins 4 jours consécutifs.
- B. Au cours de cette période de perturbation de l'humeur et d'augmentation de l'énergie ou de l'activité, au moins 3 des symptômes suivants (4 si l'humeur est seulement irritable) sont présents avec une intensité significative et représentent un changement notable par rapport au comportement habituel :
 - 1. Augmentation de l'estime de soi ou idées de grandeur.
 - 2. Réduction du besoin de sommeil (p. ex. le sujet se sent reposé après seulement 3 heures de sommeil).
 - 3. Plus grande communicabilité que d'habitude ou désir constant de parler.
 - 4. Fuite des idées ou sensations subjectives que les pensées défilent.
 - 5. Distractibilité (c.-à-d. que l'attention est trop facilement attirée par des stimuli extérieurs sans importance ou non pertinents) rapportée ou observée.
 - 6. Augmentation de l'activité orientée vers un but (social, professionnel, scolaire ou sexuel) ou agitation psychomotrice.
 - 7. Engagement excessif dans des activités à potentiel élevé de conséquences dommageables (p. ex. la personne se lance sans retenue dans des achats inconsidérés, des conduites sexuelles imprudentes).
- C. L'épisode s'accompagne de modifications indiscutables du fonctionnement, qui diffère de celui du sujet hors période symptomatique.
- D. La perturbation de l'humeur et la modification du fonctionnement sont manifestes pour les autres.
- E. La sévérité de l'épisode n'est pas suffisante pour entraîner une altération marquée du fonctionnement professionnel ou social, ou pour nécessiter une hospitalisation. S'il existe des caractéristiques psychotiques, l'épisode est, par définition, maniaque.
- F. L'épisode n'est pas imputable aux effets physiologiques d'une substance (p. ex. substance donnant lieu à abus, médicament ou autre traitement).

N.B. : Un épisode hypomaniaque complet qui apparaît au cours d'un traitement antidépresseur (p. ex. médicament, psychothérapie) mais qui persiste et remplit les critères complets d'un épisode au-delà du simple effet physiologique de ce traitement doit être diagnostiqué comme un épisode hypomaniaque. Toutefois, la prudence s'impose car un ou deux symptômes (en particulier une augmentation de l'irritabilité, de la nervosité, ou de l'agitation après la prise d'un antidépresseur) ne sont pas suffisants pour un diagnostic d'épisode hypomaniaque, et ne sont pas obligatoirement indicatifs d'une diathèse bipolaire.

Épisode dépressif caractérisé

- A. Au moins cinq des symptômes suivants sont présents pendant une même période d'une durée de 2 semaines et représentent un changement par rapport au fonctionnement antérieur ; au moins un des symptômes est soit (1) une humeur dépressive, soit (2) une perte d'intérêt ou de plaisir.

N.B. : Ne pas inclure des symptômes qui sont manifestement imputables à une autre affection médicale.

1. Humeur dépressive présente quasiment toute la journée, presque tous les jours, signalée par la personne (p. ex. se sent triste vide ou sans espoir) ou observée par les autres (p. ex. pleure).

(**N.B.** : Éventuellement irritabilité chez l'enfant et l'adolescent.)

2. Diminution marquée de l'intérêt ou du plaisir pour toutes ou presque toutes les activités quasiment toute la journée, presque tous les jours (signalée par la personne ou observée par les autres).

3. Perte ou gain de poids significatif en l'absence de régime (p. ex. modification du poids corporel excédant 5 % en un mois), ou diminution ou augmentation de l'appétit presque tous les jours.

(**N.B.** : Chez l'enfant, prendre en compte l'absence de prise de poids attendue.)

4. Insomnie ou hypersomnie presque tous les jours.

5. Agitation ou ralentissement psychomoteur presque tous les jours (constaté par les autres, non limité à un sentiment subjectif de fébrilité ou de ralentissement intérieur).

6. Fatigue ou perte d'énergie presque tous les jours

7. Sentiment de dévalorisation ou de culpabilité excessive ou inappropriée (qui peut être délirante) presque tous les jours (pas seulement se reprocher ou se sentir coupable d'être malade).

8. Diminution de l'aptitude à penser ou à se concentrer ou indécision presque tous les jours (signalée par le sujet ou observée par les autres).

9. Pensées de mort récurrentes (pas seulement une peur de mourir), idées suicidaires récurrentes sans plan précis, tentative de suicide ou plan précis pour se suicider.

B. Les symptômes induisent une détresse cliniquement significative ou une altération du fonctionnement social, professionnel ou dans d'autres domaines importants.

C. L'épisode n'est pas imputable aux effets physiologiques d'une substance ou d'une autre affection médicale

N.B. : Les critères A à C définissent un épisode dépressif caractérisé. Les épisodes dépressifs caractérisés sont fréquents au cours du trouble bipolaire 1 mais leur présence n'est pas requise pour son diagnostic.

N.B. : Les réponses à une perte significative (p. ex. deuil, ruine, pertes au cours d'une catastrophe naturelle, maladie grave ou handicap) peuvent comprendre des sentiments de tristesse intense, des ruminations à propos de la perte, une insomnie, un manque d'appétit et une perte de poids, symptômes inclus dans le critère A et évoquant un épisode dépressif. Bien que ces symptômes puissent être compréhensibles ou jugés appropriés compte tenu de la perte, la présence d'un épisode dépressif caractérisé, en plus de la réponse normale à une perte importante, doit être considérée attentivement. Cette décision fait appel au jugement clinique qui tiendra compte des antécédents de la personne et des normes culturelles de l'expression de la souffrance dans un contexte de perte¹.

Trouble bipolaire de type II

A. Les critères sont remplis pour au moins un épisode hypomaniaque (critères A-F d'« épisode hypomaniaque » *supra*) et au moins pour un épisode dépressif caractérisé (critères A-C d'« épisode dépressif caractérisé » *supra*).

B. Il n'y a jamais eu d'épisode maniaque.

C. L'apparition de(s) l'épisode(s) hypomaniaque(s) et de(s) l'épisode(s) dépressif(s) n'est pas mieux expliquée par un trouble schizoaffectif, une schizophrénie, un trouble

schizophréniforme, un trouble délirant ou un autre trouble spécifié ou non spécifié du spectre de la schizophrénie et autres troubles psychotiques.

D. Les symptômes de dépression ou l'imprévisibilité causés par l'alternance fréquente entre des périodes de dépression et d'hypomanie entraînent une souffrance importante ou une altération du fonctionnement social, professionnel ou dans d'autres domaines importants.

Procédures de codage et d'enregistrement.

Le trouble bipolaire II a un seul code diagnostique : 296.89 (F31.81).

Son statut par rapport à la gravité actuelle, la présence de caractéristiques psychotiques, l'évolution et autres caractéristiques ne peut pas être codé mais doit être précisé (p. ex. 296.89 [F31.81] trouble bipolaire II, épisode actuel dépressif, d'intensité moyenne, avec des caractéristiques mixtes; 296.89 [F31.81] trouble bipolaire II, épisode le plus récent dépressif, en rémission partielle).

¹ Pour distinguer deuil et épisode dépressif caractérisé (EDC), il peut être utile de considérer que dans le deuil les sentiments prédominants sont le vide et la perte, alors que dans un EDC c'est plutôt une humeur dépressive persistante et une incapacité à anticiper la joie ou le plaisir. La dysphorie dans le deuil est susceptible de diminuer d'intensité au fil des jours et des semaines et survient par vagues que l'on qualifie d'affres de la douleur. Ces vagues ont tendance à être associées à des pensées ou des souvenirs de la personne décédée. L'humeur dépressive d'un EDC est plus persistante et n'est pas liée à des pensées ou des préoccupations spécifiques. La douleur du deuil peut être accompagnée par des émotions positives et par de l'humour, ce qui est différent de la tristesse et de la souffrance foncières caractéristiques de l'EDC. Le contenu des pensées associées au deuil est généralement caractérisé par des préoccupations et des souvenirs concernant la personne décédée plutôt que par les ruminations autocritiques ou pessimistes observées dans un EDC. Dans le deuil, l'estime de soi est généralement préservée, tandis que dans les EDC les sentiments de dévalorisation et de dégoût de soi sont communs. Si les idées autocritiques sont présentes dans le deuil, elles impliquent typiquement des sentiments de manquements vis-à-vis du défunt (p. ex. des visites trop rares, ne pas avoir dit assez au défunt combien on l'aimait). Si une personne endeuillée pense à la fin de vie et la mort, ses pensées se concentrent généralement sur le défunt et, éventuellement, sur le fait de le rejoindre, tandis que dans un EDC de telles pensées sont centrées sur le fait de mettre fin à sa propre vie à cause de sentiments de dévalorisation, d'indignité ou d'incapacité de faire face à la douleur de la dépression.

Spécifier l'épisode actuel ou le plus récent :

Hypomaniaque

Dépressif

Spécifier si :

Avec détresse anxieuse (p. 75)

Avec caractéristiques mixtes (p. 76)

Avec des cycles rapides (p. 77)

Avec caractéristiques psychotiques congruentes à l'humeur (p. 80)

Avec caractéristiques psychotiques non congruentes à l'humeur (p. 80)

Avec catatonie (p. 80). Note de codage : utiliser le code additionnel 293.89 (F06.1).

Avec début lors du péripartum (p. 80)

Avec caractère saisonnier (p. 81) : **s'applique seulement à l'épisode dépressif caractérisé.**

Spécifier l'évolution si les critères complets pour un épisode thymique ne sont pas remplis actuellement :

En rémission partielle (p. 83)

En rémission complète (p. 83)

Spécifier la sévérité si les critères complets pour un épisode thymique ne sont pas remplis actuellement :

Léger (p. 83)

Moyen (p. 83)

Grave (p. 83)

Trouble cyclothymique

301.13 (F34.0)

A. Existence pendant au moins 2 ans (au moins 1 an chez les enfants et les adolescents) de nombreuses périodes pendant lesquelles des symptômes hypomaniaques sont présents sans que soient réunis les critères d'un épisode hypomaniaque et de nombreuses périodes pendant lesquelles des symptômes dépressifs sont présents sans que soient réunis les critères d'un épisode dépressif caractérisé.

B. Durant la période de 2 ans décrite ci-dessus (1 an chez les enfants et les adolescents), les périodes hypomaniaques et dépressives ont été présentes pendant au moins la moitié du temps et la personne n'a pas connu de période de plus de 2 mois consécutifs sans les symptômes.

C. Les critères pour un épisode dépressif caractérisé, maniaque ou hypomaniaque n'ont jamais été réunis.

D. Les symptômes du critère A ne sont pas mieux expliqués par un trouble schizoaffectif, une schizophrénie, un trouble schizophréniforme, un trouble délirant ou un trouble spécifié ou non spécifié du spectre de la schizophrénie ou un autre trouble psychotique.

E. Les symptômes ne sont pas imputables aux effets physiologiques d'une substance (p. ex. substance donnant lieu à abus, médicament) ou à une autre affection médicale (p. ex. hyperthyroïdie).

F. Les symptômes entraînent une détresse cliniquement significative ou une altération du fonctionnement social, professionnel ou dans d'autres domaines importants.

Spécifier si :

Avec détresse anxieuse (cf. p. 75).

Annexe II-Lexique

AUTISME [angl. *autism, autistic disorder*] Phénomène psychopathologique caractérisé par la tendance à se désintéresser du monde extérieur, avec repli sur soi-même.

Autisme infantile précoce terme utilisé par Kanner (1943) pour désigner une psychose apparaissant dans les premières années de la vie caractérisée par un isolement, un défaut de relation avec les autres, des stéréotypes et des désordres graves du développement du langage.

BIPOLAIRE (trouble) [angl. *Bipolar disorder*] Terme qui tend à remplacer celui de psychose maniaco-dépressive. On distingue pour l'essentiel le trouble bipolaire de type I (présence d'un ou de plusieurs épisodes maniaques) et le trouble bipolaire de type II (épisodes dépressifs majeurs récurrents avec au moins un épisode hypomaniaque). Le concept de trouble unipolaire, auquel on l'opposait antérieurement, est de moins en moins usité.

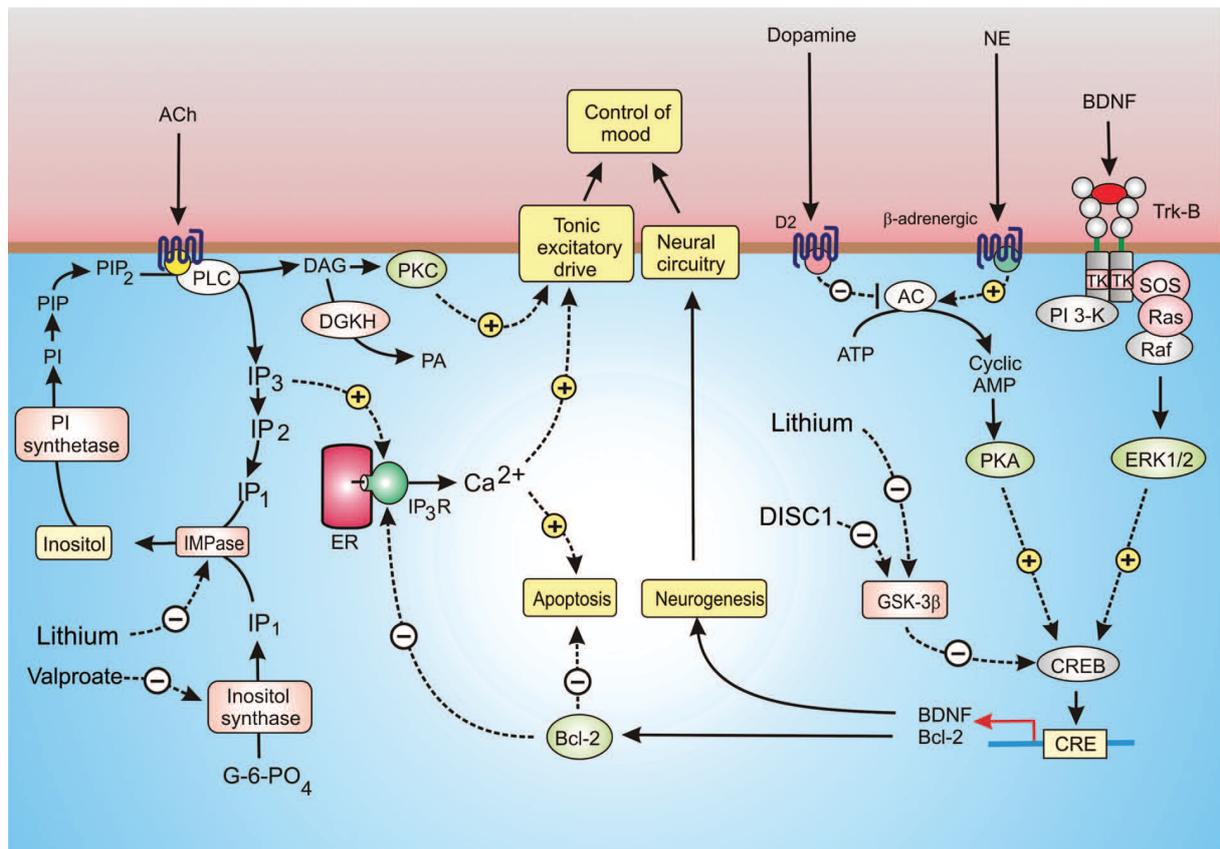
DEFICIT DE L'ATTENTION AVEC HYPERACTIVITE (Dictionnaire de médecine Flammarion (8^e Éd.) KERNBAUM Serge 2008) [angl. *ADHD*] Trouble apparaissant dans l'enfance, caractérisé par une hyperactivité motrice avec instabilité et impulsivité, accompagnée d'un déficit attentionnel et d'une distractibilité, retentissant sur le fonctionnement scolaire et la vie familiale. Parmi les mesures thérapeutiques, il est possible de proposer la prescription de méthylphénidate.

EPILEPSIE (Dictionnaire illustre des termes de médecine (30^e édition) - Garnier M, Del 2009) *s.f.* (gr. *épilambanein*, saisir) [angl. *epilepsy*] Affection chronique caractérisée par la répétition de paroxysmes dus à des « décharges épileptiques », c.-à-d. à l'activation subite, simultanée et anormalement intense d'un grand nombre de neurones cérébraux. Ces paroxysmes se traduisent par **cliniquement** par des *crises épileptiques* : celles-ci toujours soudaines, ont des aspects cliniques variables allant des crises généralisées aux crises partielles et aux absences. Elles s'accompagnent de manifestations **électroencéphalographiques** à début et à fin brusques : ce sont ces pointes brèves et amples, associées souvent à des ondes plus lentes (complexe pointe-onde) ; leur répartition, à la surface du crâne, est plus ou moins diffuse selon le type de crise. V. *Landau-Kleffner (syndrome de)*.

SCHIZOPHRENIE (Bleuler 1911) [angl. *Schizophrenia*] Psychose chronique caractérisée par une dissociation psychique, ou discordance, qui perturbe le cours de la pensée (elle devient hermétique et chaotique) altère le comportement (qui devient étrange, autistique) et bouleverse l'affectivité (archaïque et paradoxale), associée à un délire abstrait et symbolique qui élabore les thèmes d'influence alimentés par des hallucinations auditives et cénesthésiques et vécue dans une atmosphère de dépersonnalisation.

Annexe III- Figure d'article de revue

Berridge MJ. Dysregulation of neural calcium signaling in Alzheimer disease, bipolar disorder and Schizophrenia. *Prion*. 2013; 7(1):2-13.



Voies de signalisations probablement impliquées dans le trouble bipolaire (Michael J. Berridge 2013).

Le contrôle de l'humeur semble provenir d'une interaction de voies de signalisations. L'acétylcholine (ACh) tout comme la sérotonine (5-HT) stimulent l'hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5 biphosphate (PIP₂) pour générer de l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃) et du diacylglycerol (DAG). L'IP₃ se fixe au niveau de récepteurs du réticulum endoplasmique (ER) pour libérer du Ca²⁺ alors que le DAG active la protéine kinase C (PKC). Le Ca²⁺ et la PKC influencent l'humeur en modulant l'excitabilité membranaire. Le DAG est inactivé par sa phosphorylation, alors que l'IP₃ est recyclé en inositol par déphosphorylation successives jusqu'à l'intervention de l'inositol monophosphatase (IMPase) qui est sensible au lithium. D'autres neurotransmetteurs comme la dopamine ou la noradrénaline (NE) semblent fonctionner à travers la voie de transduction de l'AMP cyclique, qui active la protéine kinase A (PKA) pour phosphoryler le facteur de transcription CREB, qui contrôle l'expression du BDNF responsable de la neurogène. L'activité transcriptionnelle de CREB est inhibée par la glycogène-synthase kinase 3β, qui est inhibée par le lithium.